

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 33

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'UTILISATION
DE SERUMS D'ORIGINE ANIMALE
POUR LE CONTROLE DE LA CAPACITE
DE LIAISON DU FER PAR LE SERUM (TIBC) ;
COMPARAISON DU COMPORTEMENT
DES SERUMS NATIFS ET LYOPHILISES**

THESE

présentée à l'Université Claude-Bernard

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 14 Juin 1977

pour obtenir le grade de

DOCTEUR [REDACTED] EN PHARMACIE

par

Anny-France DURY née CHAMPELOVIER

le 9 Août 1948

à BRON (Rhône)

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N°

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'UTILISATION
DE SERUMS D'ORIGINE ANIMALE
POUR LE CONTROLE DE LA CAPACITE
DE LIAISON DU FER PAR LE SERUM (TIBC) ;
COMPARAISON DU COMPORTEMENT
DES SERUMS NATIFS ET LYOPHILISES**

THESE

présentée à l'Université Claude-Bernard

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 14 Juin 1977

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Anny-France DURY née CHAMPELOVIER

le 9 Août 1948

à BRON (Rhône)

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - IV

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'UTILISATION
DE SÉRUMS D'ORIGINE ANIMALE
POUR LE CONTRÔLE DE LA CAPACITÉ
DE LIAISON DU FER PAR LE SÉRUM (TIBC) :
COMPARAISON DU COMPORTEMENT
DES SÉRUMS NATIFS ET LYOPHILISÉS



présentée à l'Université Claude-Bernard
Unité d'enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 14 Juin 1977
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Anny-France DURY née CHAMPELOVIER

le 9 Août 1978

à BRON (Rhône)

— UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I —

Président de l'Université	M. le Professeur D. GERMAIN
Vice Président	M. le Professeur E. ELBAZ
Deuxième Vice Président	M. B. ROUSSET
Troisième Vice Président	M. R. LOPEZ
Secrétaire Général	M. RAMBAUD

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE L'UNIVERSITE :

Médecine :	GRANGE BLANCHE	M. le Docteur B. SALLE (MCA)
	ALEXIS CARREL	M. le Professeur R. MORNEX
	SUD-OUEST	M. le Professeur J. NORMAND
	LYON NORD	Directeur : M. le Docteur J.P. NEIDHARDT
		Directeur honoraire : M. le Professeur A. BERTOYE
Biologie Humaine		M. le Docteur J.P. REVILLARD (MCA)
Techniques de Réadaptation		M. le Docteur A. MORGON (MCA)
Sciences Pharmaceutiques		M. le Professeur BIZOLLON
Sciences Odontologiques		M. le Docteur R. VINCENT
Institut régional d'éducation physique et sportive ..		Président du conseil d'UER : M. le Professeur R. GUILLET,
		Directeur M. A. MILLON
Mathématiques		M. le Professeur E. COMBET
Physique		M. le Professeur J. DELMAU
Chimie et Biochimie		M. le Professeur J. HUET
Sciences de la Nature		M. le Professeur R. GINET
Sciences Physiologiques		Mlle le Professeur J.F. WORBE
Institut Universitaire et Technologie n°1		M. le Professeur B. POUYET
Institut Universitaire et Technologie n°2		M. J. GALLET (Directeur ENSAM)
Observatoire		M. M. MONNET (Astronome Adjoint)
Physique Nucléaire		M. le Professeur GUSAKOW
Mécanique		Mlle le Professeur G. COMPTE-BELLOT.



Examineurs de la Thèse :

Président : Monsieur le Professeur J. DORCHE

Assesseurs : Monsieur le Professeur Ch. COLLOMBEL
Monsieur L. MONNET, Biologiste des Hôpitaux
Madame M. VERNET-NYSSSEN, Biologiste Adjoint des Hôpitaux.

Je dédie ce travail

A mon mari

A mes parents

A mes frères et soeurs

A mes beaux parents

A toute ma famille

A tous mes amis.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur J. DORCHE

Nous lui sommes reconnaissante d'avoir bien voulu s'intéresser à notre travail et apporter de précieux conseils tout au long de sa réalisation.

Nous avons toujours apprécié sa disponibilité, sa droiture et sa simplicité qui font régner une atmosphère de confiance dans son laboratoire.

Nous le remercions pour le grand honneur qu'il nous fait en acceptant de présider notre thèse.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur Ch. COLLOMBEL,

Il a très aimablement accepté de siéger parmi notre jury. Nous sommes très sensible à l'honneur qu'il a bien voulu nous faire et nous le prions de croire à notre profond respect.

Monsieur L. MONNET
Biologiste des Hôpitaux

*Nous le remercions de l'amabilité avec laquelle il nous a accueilli et de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à notre travail en acceptant de le juger.
Qu'il trouve ici l'expression de notre grand respect.*

Madame M. VERNET-NYSSEN
Biologiste adjoint des Hôpitaux

*Elle nous a toujours aimablement accueillie, ne nous ménageant ni son temps ni son aide. Par ses précieux conseils elle a contribué très efficacement à l'élaboration de ce travail.
Nous ne saurions trop l'en remercier et voulons l'assurer à cette occasion de toute notre sympathie.*

CHAPITRE I

INTRODUCTION

En pratique hospitalière, il est d'usage de vérifier quotidiennement la qualité des résultats fournis par les méthodes d'analyses utilisées. Ces contrôles sont apparus indispensables lorsqu'on a remarqué l'extrême dispersion des résultats obtenus par différents laboratoires, pour un même échantillon (17). Ces contrôles ne sont possibles qu'à la condition de disposer de sérums de référence.

On a d'abord utilisé des pools congelés de sérums d'origine humaine de concentration connue : puis sont apparus les sérums de contrôle du commerce dont l'emploi s'est généralisé depuis quelques années.

Les sérums de contrôle peuvent être classés (23-29) en deux groupes :

- Les sérums monovalents, qui ne vérifient qu'un élément ou un groupe limité d'éléments (k, Na, Bilirubine ...).
- Les sérums polyvalents qui vérifient :
 - . Les principaux constituants d'un sérum
 - . Les enzymes
 - . Ces deux groupes d'éléments à la fois.

On peut également utiliser des sérums non titrés. Etant donné l'importance de leur rôle, les sérums de contrôle doivent présenter un certain nombre de qualités (2-9) :

- Stabilité,
- Homogénéité,
- Limpidité,
- Composition la plus proche possible du sérum humain,
- Comportement identique à celui d'un sérum humain (9).

Il convient de prendre certaines précautions lors de leur utilisation :

- Pour garantir l'homogénéité, les flacons de sérums lyophilisés sont réunis dans un pool, puis répartis en aliquotes ;
- Stockage à basse température pour assurer une bonne stabilité ;
- Dosages effectués en double chaque jour.

TROUYEZ (29) définit le sérum idéal :

"Sérum humain normal ou pathologique, liquide, limpide dont la stabilité serait assurée pour une longue période par un procédé n'entraînant aucune dénaturation du sérum d'origine".

En fait, les sérums de contrôle actuellement utilisés diffèrent des sérums de patients par de nombreux points (2) :

- Leur origine, donc leur composition, dans le cas des sérums animaux ;
- La conservation avant préparation ;
- Les traitements préliminaires : congélation, surcharges, dialyse ;
- Les additifs essentiels (conservateurs...) ;
- Leurs propriétés originelles sont toujours plus ou moins modifiées : protéines dénaturées, pH, turbidité...

L'utilisation systématique des sérums d'origine humaine n'est pas nécessaire, leurs inconvénients en effet, sont loin d'être négligeables : troubles après remise en solution, conservation limitée, prix de revient éle-

-vé, emploi sévèrement réglementé. La tendance actuelle de l'O.M.S. est de limiter l'utilisation de ces sérums aux examens pour lesquels aucun sérum d'origine animale ne peut convenir. C'est pourquoi on utilise de plus en plus des sérums d'origine animale, mais il faut alors vérifier leur identité de comportement avec le sérum humain (3-28).

Dans le cas particulier de la capacité totale de fixation du fer par le sérum ou "Total-Iron-Binding-Capacity (TIBC ^{*})", des contradictions ont été relevées par BUTLER (8) qui a signalé la faible crédibilité du sérum bovin dont la TIBC varie en fonction de la quantité d'hydrocarbonate de magnésium (HC.Mg ^{**}) ajoutée (Technique de RAMSAY -25-). D'autre part, une étude portant sur plusieurs sérums du commerce (30) a révélé qu'un certain nombre de sérums humains étaient inutilisables pour le contrôle de la TIBC.

Nous nous sommes attachée à vérifier la validité des sérums du commerce d'origine animale, dans le contrôle de la capacité de fixation du fer par le sérum. L'examen des résultats fournis par les diverses expériences nous a incitée à étudier le comportement de sérums natifs provenant des mêmes espèces animales ; enfin, les sérums natifs ont été soumis à une lyophilisation ce qui a permis une comparaison avec les sérums lyophilisés du commerce.

x TIBC : Total - Iron - Binding-Capacity : abréviation utilisée dans la suite de la thèse.

xx HC.Mg : Hydrocarbonate de magnésium ; abréviation utilisée dans la suite de la thèse.

CHAPITRE II

LA FIXATION DU FER SUR LA TRANSFERRINE HUMAINE

I. RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DE LA TRANSFERRINE

Dans le sérum humain, le fer non hémique est sous forme ferrique, lié à une β globuline : la transferrine. Absorbé au niveau intestinal, le fer est ainsi transporté jusqu'aux organes hématopoiétiques et de stockage. Si la transferrine joue un rôle essentiel dans le métabolisme de ce cation, on sait qu'elle a aussi une action inhibitrice des croissances bactérienne et virale (18-26-31).

La transferrine est une glycoprotéine, synthétisée par le foie. Son poids moléculaire a fait l'objet de résultats contradictoires ; selon la technique utilisée, la valeur proposée était comprise entre 76 000 (12) et 100 000 (4). Les travaux les plus récents indiquent un poids moléculaire voisin de 82 000 (5).

Si on déduit le poids moléculaire de la capacité de la transferrine à se saturer en fer, on trouve une valeur de 89 000 (27) que nous retiendrons dans ce travail basé exclusivement sur la détermination de la TIBC.

La transferrine est formée de deux chaînes hétérosaccharidiques et d'une seule chaîne polypeptidique. Chaque molécule fixe deux atomes de fer, c'est-à-dire qu'1 mg de protéine fixe 1,25 μ g de fer.

On sait depuis AISEN (1) que la transferrine possède deux sites de fixation indépendants l'un de l'autre. La liaison Fer-Transferrine qui engage trois résidus tyrosine et deux résidus histidine (5) n'est possible

que si l'atome de fer est complexé avec une petite molécule chélatrice possédant un ou plusieurs groupements carboxyliques (Nitrilotriacétate, oxalate, bicarbonate) (1). En fait, des travaux plus récents (24) indiquent que seul le bicarbonate est indispensable à la fixation du fer par la transferrine. Le complexe Transferrine(Fe^{III})₂ - (Bicarbonate)₂ ainsi formé donne au sérum une coloration caractéristique rose saumon, avec un maximum d'absorption à 465 nm (26).

L'étude des effets du pH sur la transferrine humaine (16) montre que les deux sites de fixation diffèrent dans l'aptitude à libérer leur fer après acidification. Pour un pH inférieur à 6,7 la transferrine diferrique perd un atome de fer et il se forme préférentiellement une molécule monoferrique plus stable qui résiste assez bien à la dénaturation acide. Il semble que l'on puisse attribuer ces différences entre les deux sites à des changements dans la structure tertiaire de la molécule.

Cette hétérogénéité fonctionnelle constatée chez l'homme, ne se retrouve pas chez le lapin (14) ; elle serait pourtant à la base de la régulation du métabolisme du fer.

II. ETUDE PERSONNELLE

2-1 MATERIEL ET METHODE

2- 1-1 Principes des méthodes

2-1-1-1 Fer sérique

Le sérum est acidifié par une solution chlorhydrique 0,5 N contenant 0,5 % d'Acide Ascorbique. Cette solution acide, de pH voisin de 1, donne à l'entrée du dialyseur, après mélange avec le sérum, un pH de 2. A ce

pH, il y a libération du fer de sa liaison avec la transferrine et réduction à l'état ferreux. Les protéines sont éliminées par une dialyse contre un tampon acéto-acétique de pH 4,65. Les ions ferreux présents dans le dialysat sont révélés par une solution de Ferrozine. La coloration est lue à 560 nm.

2-1-1-2 Capacité totale de fixation du fer (TIBC)

On ajoute un très large excès de fer au sérum (10 mg/l) ; au cours des dix minutes de contact, la transferrine libre se sature totalement. On élimine l'excès de fer non fixé par addition d'hydrocarbonate de magnésium : l'adsorption est accélérée par une agitation mécanique constante de 20 minutes. Sur le surnageant on dose le fer total par le même procédé que pour le fer sérique.

On obtient ainsi la TIBC

2-1-2 Matériel

Autoanalyseur Technicon Ière génération, comprenant :

- Un SAMPLER II,
- Une pompe proportionnante deux vitesses,
- Un dialyseur à 37°C (Membrane CUPROPHAN),
- Un colorimètre,
- Un enregistreur équipé d'un expanseur d'échelle.

2-1-3 Technique

2-1-3-1 Réactifs

a - Solution acide réductrice

. Ac. L.Ascorbique			2,5 g
. Ac. Chlorhydrique	0,5 N	QSP	500 ml

Se conserve une semaine à +4°C.

b - Tampon pH 4,65

. Acétate de Sodium, $3H_2O$	136 g
. Dissoudre dans eau distillée	1500 ml
. Acide Acétique	60 ml
. Eau distillée QSP	2000 ml

Se conserve à $+4^{\circ}C$.

c - Révélateur

. Ferrozine	0,30 g
. Néocuproïne	0,30 g
. Dissoudre dans HCL 8,2 N	2 ml
. Eau distillée QSP	500 ml

Se conserve bien à $+4^{\circ}C$.

d - Solution stock de fer, 200 mg/l

Dissoudre 200 mg de fer électrolytique dans 10 ml de HCL 6N mélangé à 10 ml de HNO_3 6N. Après dissolution à chaud, compléter à un litre avec eau bidistillée.

e - Solutions étalons à 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 et 20 mg/l

Elles sont obtenues par simple dilution de la solution stock précédente dans l'eau bidistillée.

f - Solutions étalons protéiques

Réaliser un pool de sérums de 160 ml environ. On utilisera de préférence des sérums sur lesquels le fer a déjà été dosé ; on ne retient que

les sérums clairs, non ictériques, non hémolysés dont la sidérémie est inférieure à 0,5 mg/l.

. Etalon à 3 mg/l	10 ml		
. Etalon à 10 mg/l		5 ml	
. Etalon à 20 mg/l			5 ml
. Eau bidistillée		5 ml	5 ml
. Pool de sérums, QSP	50 ml	50 ml	50 ml
fer ajouté en mg/l	0,60	1,00	2,00

g - Hydrocarbonate de Magnésium. MERCK (Réf. 5827)

2-1-3-2 Manifold

Le manifold utilisé est représenté par la figure 1.

Les indications portées correspondent aux normes Technicon.

2-1-3-3 Manipulation

a - Fer sérique

Le pool de sérums est centrifugé ; le sérum est réparti dans des godets.

b - TIBC

Dans un tube à fond rond, introduire :

. Sérum	1,5 ml
. Etalon 10 mg/l	1,5 ml

Laisser en contact 10 minutes à température du laboratoire.

Ajouter : HC.Mg 0,3 g

Mélanger. Agiter sur un agitateur mécanique pendant 20 minutes.

Centrifuger 10 minutes, à 4000 tours/minute.

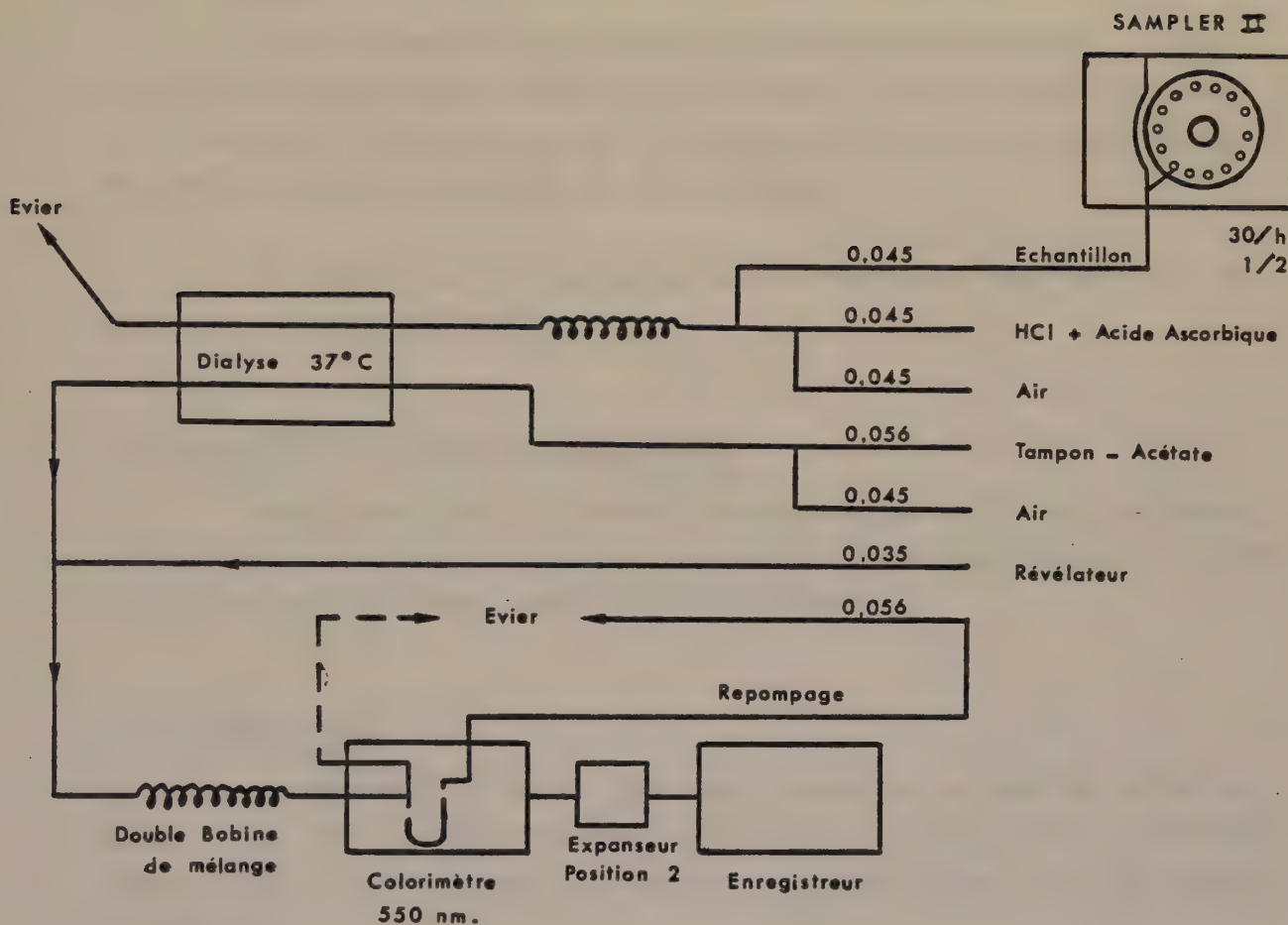


figure 1 - SCHEMA DE MONTAGE

Le surnageant parfaitement limpide est mis dans un godet et traité comme un fer sérique.

2-1-3-4 Calculs

Noter la densité optique des trois étalons protéiques. Les trois points s'alignent suivant une droite qui coupe l'axe des ordonnées ; noter la D.0 au point d'intersection (elle correspond au fer du pool non surchargé), et la soustraire de celle de chaque étalon.

On obtient une droite qui passe par l'origine. Pour les TIBC, on multiplie le résultat final par 2.

2-2 RESULTATS SUR POOL DE SERUMS HUMAINS

Nous avons étudié différents paramètres susceptibles d'influencer la fixation du fer par la transferrine humaine. Pour chaque étude, nous avons utilisé un pool de sérums humains natifs différents.

2-2-1 Répétabilité

La répétabilité de la TIBC a été testée sur un pool de sérums humains frais, dont la sidérémie était de 0,72 mg/l. La TIBC a été déterminée trente fois. Les écarts notés par rapport au chiffre moyen n'ont pas dépassé 0,04 mg/l.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 2.

Chiffre individuel TIBC (mg/l)	Chiffre moyen (mg/l)	Variance	Ecart-type	Coefficient Variation
11 x 2,48	2,51	7,34	2,71	1,08 %
15 x 2,52				
4 x 2,56				

TABLEAU 2 - Reproductibilité intrasérie - TIBC (mg/l)

On peut considérer que la capacité de fixation du fer par un pool de sérums humains présente une bonne reproductibilité intrasérie, car son coefficient de variation est de 1,08 %.

2-2-2 Influence de la quantité de fer apportée

La TIBC a été déterminée sur quatre pools de sérums surchargés en fer (30). Les quantités de fer ajoutées à un litre de sérum étaient comprises entre 0,2 et 10 mg. Chaque essai a été pratiqué en double exemplaire.

La figure 3 montre l'évolution de la TIBC suivant la quantité de fer apportée au sérum : on remarque que d'un pool à l'autre, les courbes ont une allure légèrement différente. Seule la TIBC du pool 3 atteint un plateau constant pour une concentration en fer supérieure à 6 mg. Les trois autres pools montrent une cassure de la courbe correspondant à une saturation totale de la transferrine puis une augmentation minime de la TIBC pour des quantités de fer apportées, comprises entre 2 et 10 mg/l.

Il semble que l'hydrocarbonate de magnésium soit impuissant à fixer tout l'excès de fer.

Il importe cependant de pouvoir doser des capacités latentes très élevées rencontrées notamment au cours des anémies ferriprives, c'est pourquoi la concentration de 10 mg a été retenue pour la solution de saturation.

2-2-3 Cinétique de fixation

Un pool de sérums et la solution saturante ont été mis en contact (30). La réaction a été bloquée par addition de HC.Mg (qui fixe l'excès de fer) à des temps compris entre 1 et 60 minutes.

La courbe 4 montre que la fixation du fer sur le sérum humain natif est presque immédiate. En effet, dès la deuxième minute la TIBC atteint sa valeur maximale.

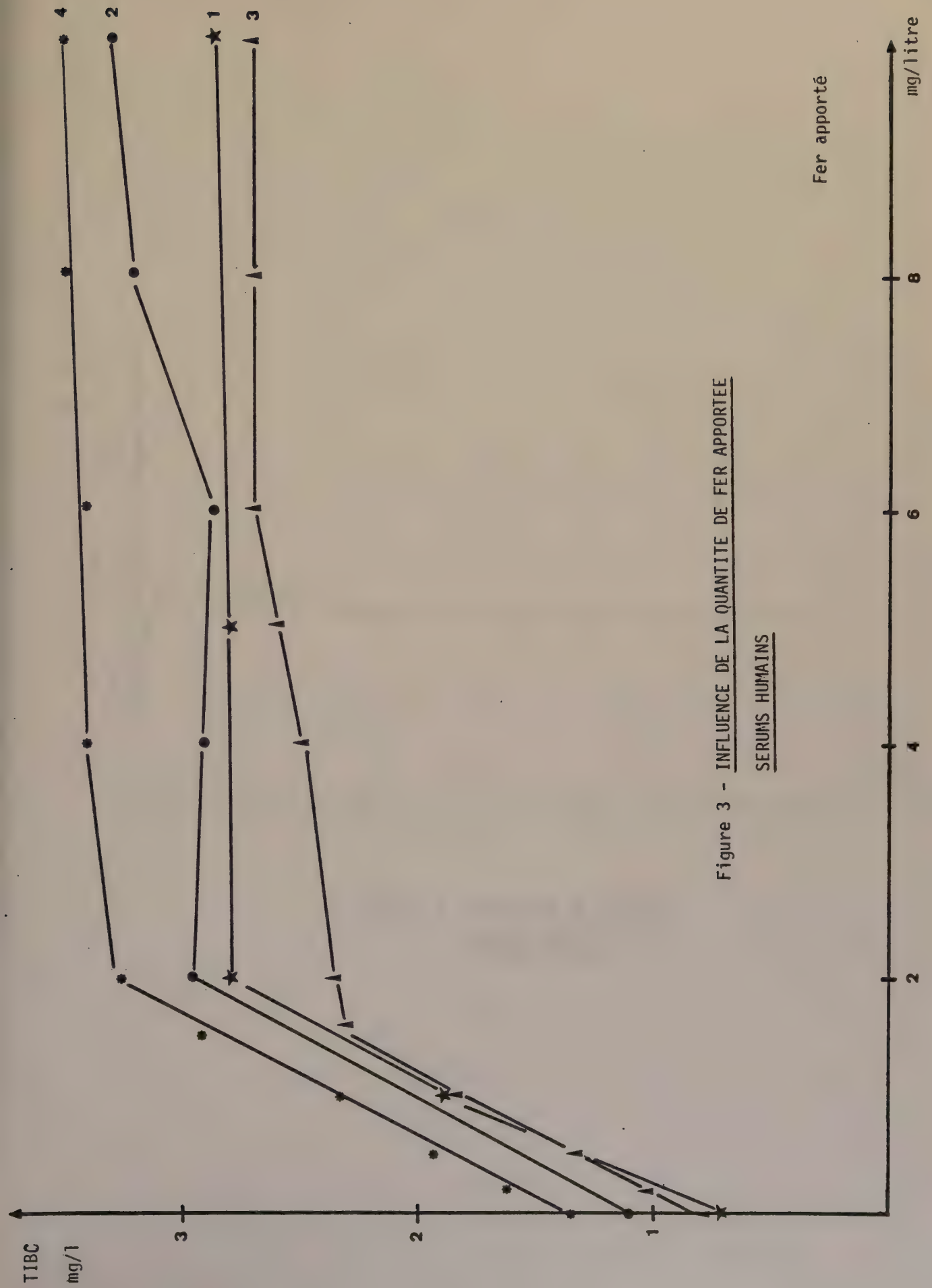


Figure 3 - INFLUENCE DE LA QUANTITE DE FER APPOTEE

SERUMS HUMAINS

Fer apporté

mg/litre

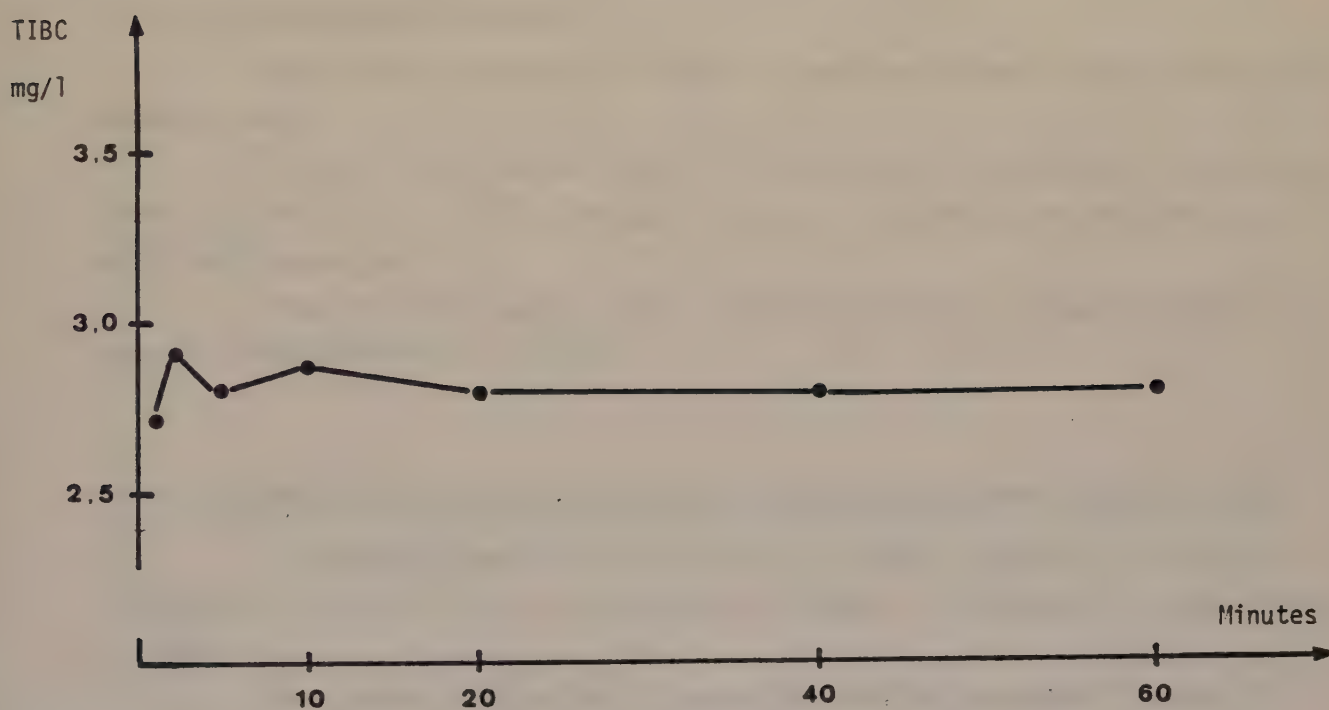


Figure 4 - CINETIQUE DE FIXATION
SERUMS HUMAINS

2-2-4 Influence de la température

Nous avons mis la solution saturante en contact avec un pool de sérums à la température ambiante et à 37°C. La TIBC a été déterminée cinq fois pour chaque température. La moyenne obtenue à 20°C est de 2,72 mg/l, à 37°C elle est de 2,68 mg/l. Nous vérifions donc que la fixation du fer in vitro est relativement indépendante de la température.

2-2-5 Influence du pH du sérum

Nous avons déterminé la TIBC d'un pool de sérums à deux valeurs différentes de pH.

Au pH initial du pool (8,5), la TIBC était de 2,46 mg/l. Après ajustement du pH à 7,3, la TIBC était de 2,43 mg/l. (La TIBC a été déterminée six fois pour chaque pH).

Pour un sérum humain natif, l'influence du pH n'intervient donc pas dans la détermination de la TIBC.

2-2-6 Influence de la quantité de HC.Mg ajoutée pour adsorber l'excès de fer

La quantité ajoutée de HC.Mg est un facteur important qui peut contribuer aux variations entre laboratoires et même à l'intérieur d'un laboratoire (15).

Nous avons fait varier la quantité de HC.Mg apportée (Tableau 5)

		TIBC (mg/litre)		
pH	HC.Mg	100 mg	200 mg	300 mg
8,5		2,86	2,56	2,46
7,3		2,82	2,51	2,43

Tableau 5 - Influence de la quantité de HC.Mg ajoutée

Il apparait qu'un apport de 100 mg est insuffisant pour fixer l'excès de fer. Nous considérerons qu'un apport de 300 mg de HC.Mg est nécessaire pour obtenir la saturation en fer ; une étude préalable a montré par ailleurs que cette quantité de HC.Mg était suffisante pour obtenir la saturation complète de la transferrine.

La même étude réalisée à un pH de 7,3 donne des résultats superposables. Il semble que pour le sérum humain, la variation du pH ne rend pas la TIBC dépendante de la quantité de HC.Mg ajoutée.

III. CONCLUSIONS

L'étude des sérums humains natifs montre une bonne reproductibilité intrasérie avec un coefficient de variation de 1 %.

La saturation de la transferrine humaine est facilement atteinte avec un apport en fer compris entre 2 et 10 mg ; de plus, cette saturation est presque instantanée.

La température de la réaction, le pH du sérum et la quantité de HC.Mg ajoutée n'interviennent pas de façon significative dans la fixation du fer.

On peut donc dire que tous ces paramètres sont sans influence sur le sérum humain natif, et se demander quel sera le comportement des sérums de contrôle animaux du commerce dans des conditions analogues.

CHAPITRE III

CAPACITE TOTALE DE LIAISON DU FER PAR DES SERUMS ANIMAUX LYOPHILISES DU COMMERCE

I. RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE DE L'UTILISATION DE SERUMS ANIMAUX POUR L'ETUDE DE LA TIBC.

Peu d'auteurs, actuellement, ont utilisé les sérums animaux du commerce dans une technique de dosage de la TIBC.

BUTLER (8) a travaillé sur des sérums de plusieurs espèces animales (boeuf, cheval...) et sur des sérums humains pour lesquels la TIBC a été déterminée en utilisant des quantités de HC.Mg variant de 250 mg à 2 g. Cet auteur a constaté chez l'animal, sur des sérums frais et lyophilisés, une diminution des valeurs observées de la TIBC pour des quantités croissantes de HC.Mg ajoutées. Par contre, 250 mg suffisent à fixer l'excès de fer d'un sérum humain.

Cette dépendance des sérums animaux vis à vis du HC.Mg avait déjà été signalée par LEGGATE et CROOKS (15) pour des sérums lyophilisés d'origine bovine. Les auteurs ont introduit, de plus, la notion de variation de la capacité totale de fixation du fer en fonction du pH du sérum : si on abaisse le pH en dessous de 8,5, la TIBC devient indépendante de la quantité de HC.Mg apportée.

Cette étude bibliographique nous a incitée à vérifier l'utilité des sérums animaux du commerce pour la détermination de la TIBC.

II. MATERIEL ET METHODE

2-1 MATERIEL

2-1-1 Espèces choisies

Notre étude a porté sur des sérums d'origine bovine, équine et porcine. Ce sont en effet les espèces les plus fréquemment utilisées pour la fabrication des sérums de contrôle.

2-1-2 Produits testés

Nous avons comparativement essayé :

- Deux sérums de porc de concentration connue

LYOTROL "A" (*)	Lot 01501	(LYOTROL A-I)
	Lot 01603	(LYOTROL A-II)

- Un sérum de porc non titré

LYOTROL "AX"	Lot 01601
--------------	-----------

- Deux sérums de cheval de concentration connue

SERONORM (xx)	Lot 120	(SERONORM I)
	Lot 122	(SERONORM II)

- Deux sérums de boeuf non titrés

BIOTROL 00 (xxx)	Lot n° 1	(BIOTROL 00 - I)
	Lot n° 2	(BIOTROL 00 - II)

2-2 METHODE

Les sérums ont été reconstitués avec de l'eau distillée ou bidistillée selon les indications du fabricant. Ils ont été analysés, le jour

(*) Laboratoires BIOMERIEUX

(xx) Laboratoires NYEGAARD. Distributeur : FUMOUE

(xxx) Laboratoires BIOTROL

même de leur reconstitution, par la technique décrite au chapitre précédent pour l'étude de la TIBC.

Sur chaque sérum on a pratiqué un certain nombre de dosages ; les résultats ont été exprimés en mg de fer par litre de sérum.

III- TRAVAIL PERSONNEL

3-1 REPRODUCTIBILITE

3-1-1 Reproductibilité intrasérie (Répétabilité)

La reproductibilité de la TIBC a été comparativement testée sur trois sérums animaux commerciaux provenant de chacune des trois espèces. Pour chacun d'eux, la capacité totale de fixation du fer a été déterminée trente fois.

Le tableau 6 regroupe l'ensemble des résultats ; nous y avons fait figurer les valeurs individuelles et les moyennes. Nous avons calculé l'écart-type et le coefficient de variation.

Pour chaque sérum le coefficient de variation est inférieur ou égal à 1%, ce qui représente une bonne reproductibilité intrasérie.

	Chiffre Individuel	Chiffre Moyen	Ecart- Type	Coefficient Variation
LYOTROL A-I	16 x 6,46 8 x 6,52 6 x 6,40	6,46	4,15	0,64
SERONORM I	2 x 4,76 14 x 4,82 9 x 4,84 3 x 4,90	4,83	3,05	0,63
BIOTROL 00-I	8 x 5,12 12 x 5,16 8 x 5,22 5,28 5,36	5,18	5,52	1,06

Tableau 6 - Reproductibilité intrasérie - (TIBC mg/l)

3-1-2 Reproductibilité intersérie

Par ailleurs, nous avons eu l'occasion de tester ces mêmes sérums au cours de diverses expériences. Les valeurs obtenues dans chaque cas sont réunies dans le tableau 7. Nous constatons que la reproductibilité intersérie est mauvaise.

	Chiffre Individuel	Chiffre moyen
LYOTROL A-I	6,41 5,71 6,77 5,75 6,53	6,23
SERONORM I	4,72 4,49 4,47 4,90 4,45	4,61
BIOTROL 00-I	5,51 5,505 6,07 6,32 5,63	5,81

Tableau 7 Reproductibilité intersérie (TIBC mg/l)

3-2 INFLUENCE DE LA QUANTITE DE FER APPORTEE

Aux sérums précédemment étudiés (LYOTROL A-I, SERONORM I, BIOTROL 00-I) nous avons apporté des quantités croissantes de fer comprises entre 1 et 10 mg par litre de sérum. Les essais ont été pratiqués en triple exemplaire. Les différentes courbes obtenues sont regroupées dans la figure 8.

Pour confirmer les résultats obtenus, nous avons effectué la même étude sur des lots différents de ces trois sérums (figure 9).

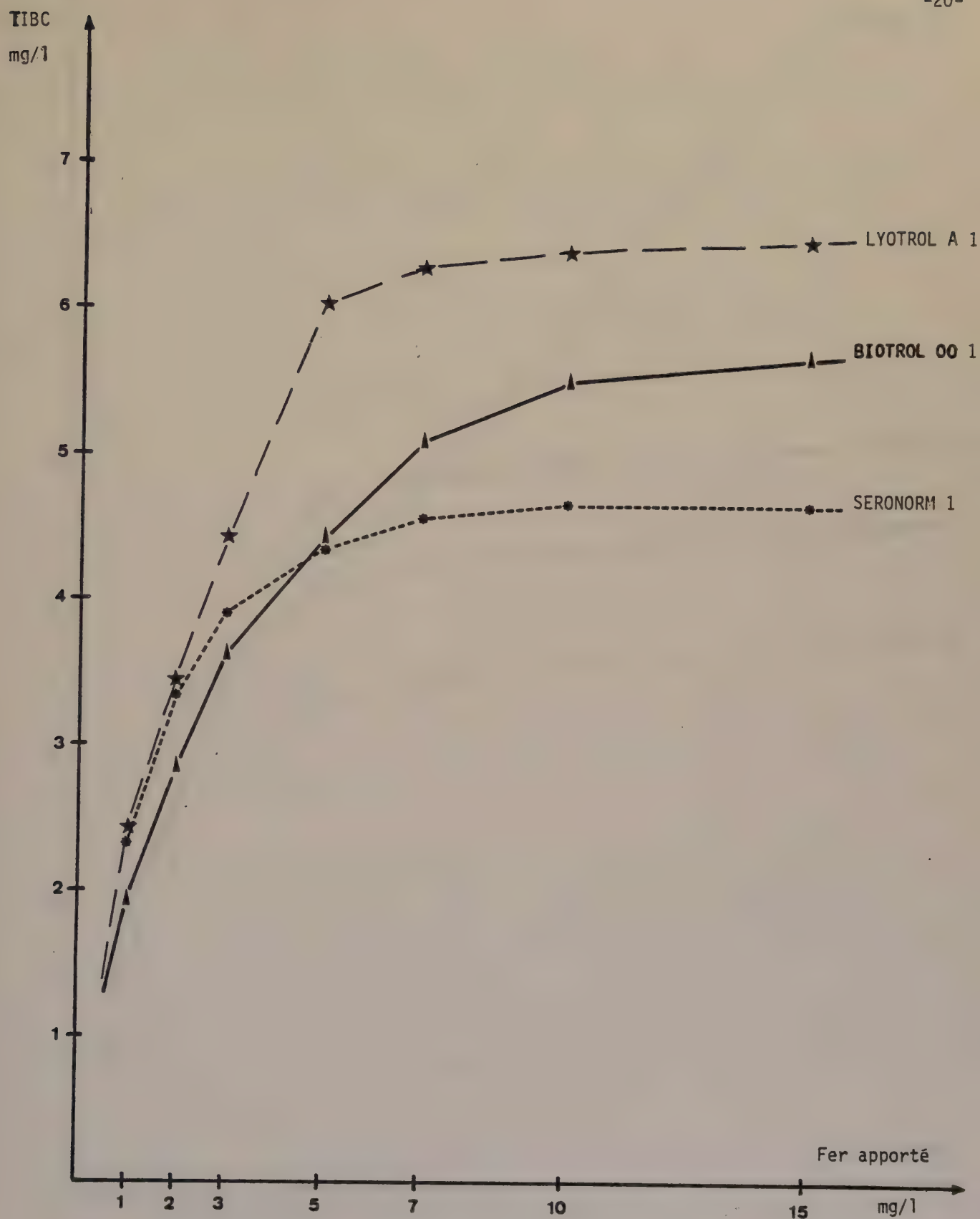


Figure 8 - INFLUENCE DE LA QUANTITE DE FER APPOREE
SERUMS LYOPHILISES COMMERCIAUX

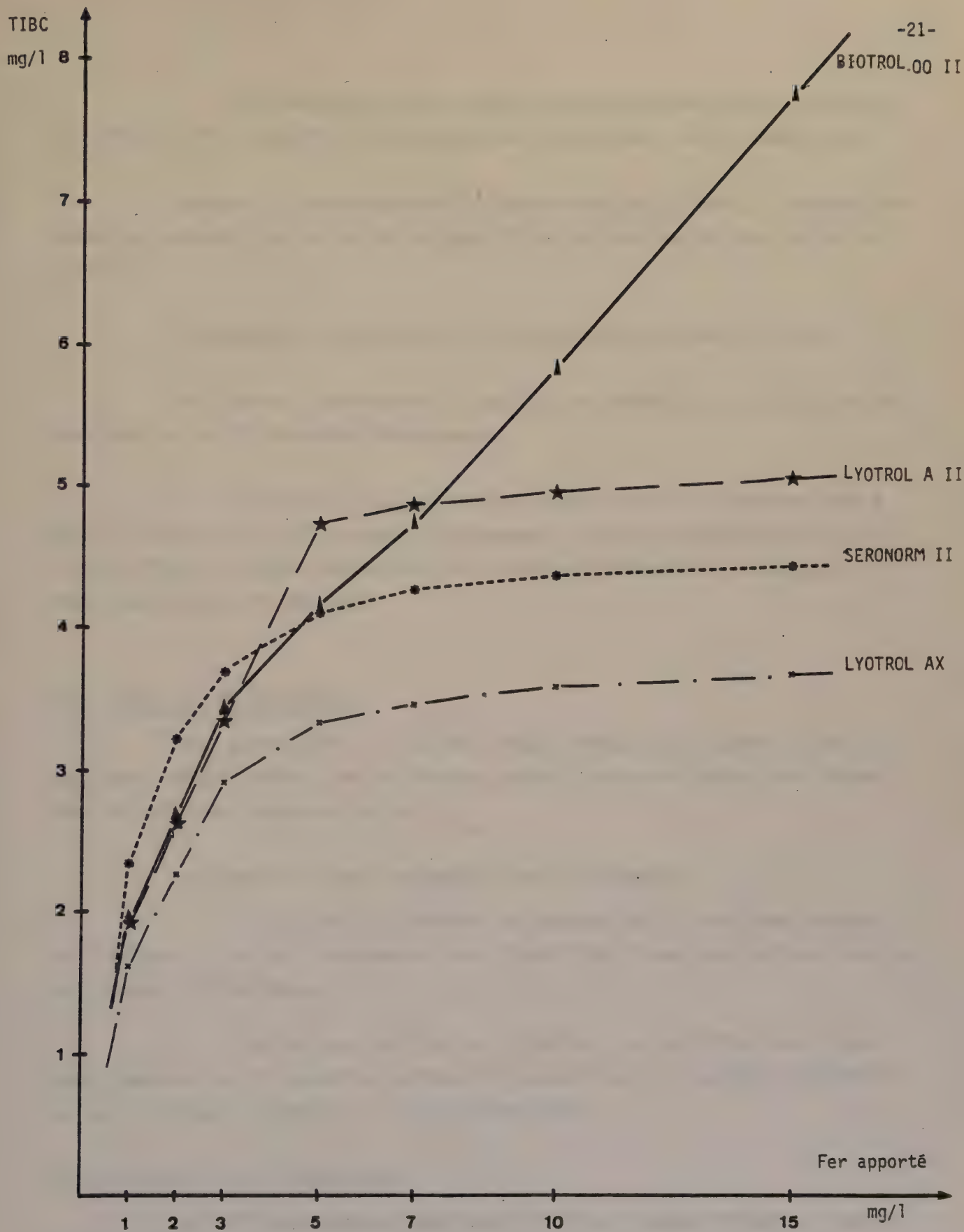


Figure 9 - INFLUENCE DE LA QUANTITE DE FER APPOREE
SERUMS LYOPHILISES COMMERCIAUX

- La comparaison des courbes obtenues montre que le Seronorm, le Lyotrol A et le Lyotrol AX se comportent sensiblement de la même façon :

Lorsque la saturation de la transferrine est totale, la courbe présente une cassure plus ou moins marquée. Elle est très nette dans le cas du Lyotrol A.

La saturation est obtenue par une addition en fer de 5 mg/l.

Ces courbes présentent la même allure générale que celles des sérums humains natifs étudiés précédemment.

- Le Biotrol 00, par contre, a une courbe de fixation tout à fait différente. La TIBC augmente constamment ; plus on ajoute de fer, plus il s'en fixe. Il paraît impossible de saturer ce sérum bovin. La figure 9 rend compte de cette anomalie.

3-3 CINETIQUE DE FIXATION

Nous avons dosé la TIBC des sérums animaux en ajoutant le HC.Mg à des temps compris entre 1 et 60 minutes après la mise en contact des sérums avec la solution saturante de fer.

Les résultats sont regroupés dans la figure 10.

- Le Lyotrol A-I atteint un plateau dès la troisième minute ; la fixation du fer sur le sérum de porc lyophilisé, comme sur le sérum humain, est presque instantanée.

- Les valeurs de TIBC du SERONORM I et du BIOTROL 00-I évoluent pendant les 10 premières minutes de contact avec la solution saturante et se stabilisent à partir de la quinzième minute.

3-4 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

La TIBC a été déterminée douze fois pour chaque sérum à la température du laboratoire et à 37°C.

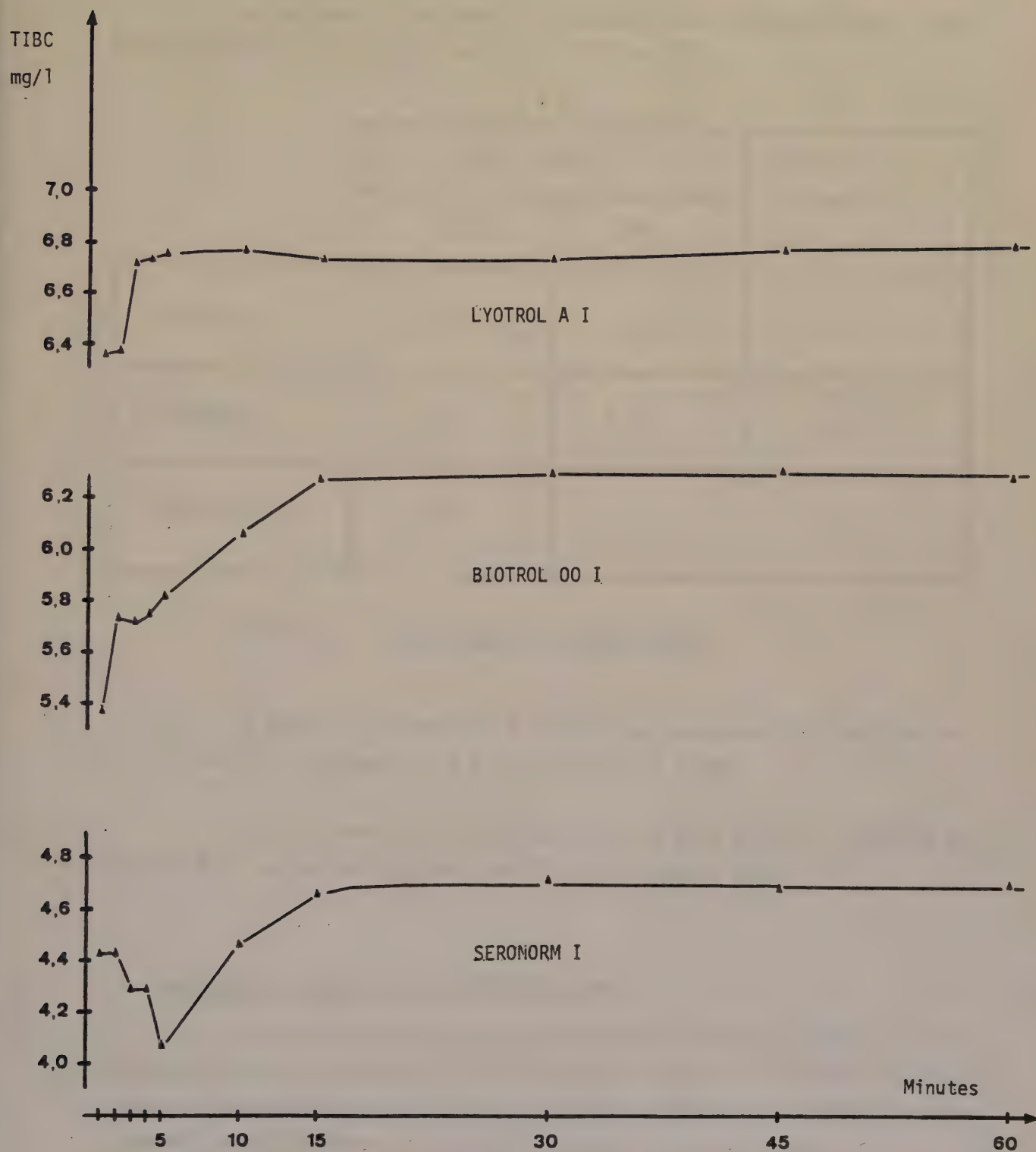


Figure 10 - CINETIQUE DE FIXATION

SERUMS LYOPHILISES COMMERCIAUX

Le tableau 11 regroupe les moyennes des valeurs obtenues pour chaque espèce et le rapport des TIBC à 37°C et 20°C.

	TIBC (mg/l)		TIBC 37°
	20°C	37°C	<u> </u> TIBC 20°
LYOTROL A-I	5,75	6,18	1,07
SERONORM I	4,90	5,55	1,13
BIOTROL 00-I	6,32	7,11	1,10

Tableau 11 - Influence de la température

On note à la température de 37°C une augmentation sensible de la TIBC des trois sérums, de 7 à 13% suivant le sérum.

Cette augmentation des valeurs de la TIBC est significative par rapport à la variation observée avec un sérum humain natif.

3-5 INFLUENCE DU TAUX DE DILUTION DU SERUM

La capacité totale de fixation du fer des trois animaux testés a été déterminée en maintenant fixe le volume de sérum et en faisant varier le volume de solution saturante de fer, de telle sorte que la quantité de fer apportée reste constante et égale à 10 mg par litre de sérum.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 12.

Sérum (ml)	Solution Fer (ml)	Titre de la solu- tion (mg/l)	Dilution du Sérum	TIBC (mg/l)		
				LYOTROL I	SERONORM I	BIOTROL I
1,5	5	3	3/13	5,34	4,24	5,00
1,5	3	5	1/3	5,52	4,37	5,31
1,5	1,5	10	1/2	5,71	4,49	5,505
1,5	1	15	3/5	5,84	4,47	5,99

Tableau 12 - Influence du taux de dilution du sérum

La TIBC augmente avec la concentration du sérum ; il apparaît que moins on dilue le sérum et plus on fixe de fer. Ceci est surtout remarquable pour le Biotrol 00, le Seronorm semble moins sensible à cette dilution du sérum.

3-6 INFLUENCE DU pH

Des dosages comparatifs de TIBC ont été effectués au pH initial du sérum reconstitué et à un pH d'environ 7,3, pour le Séronorm et le Biotrol 00 ; Le Lyotrol après reconstitution a déjà un pH voisin de la neutralisation, nous nous sommes donc limités à ce pH pour la détermination de sa TIBC (Tableau 13). Chaque sérum a été soumis à trois dosages.

On constate des différences importantes pour le Séronorm et le Biotrol 00 ; les différences sont d'autant plus marquées que le pH initial du sérum est élevé (Biotrol 00).

On note cependant, pour chaque espèce une similitude certaine de comportement des différents lots.

		LYOTROL			SERONORM				BIOTROL 00			
		A-I	A-II	AX	I		II		I		II	
pH HC.Mg		7,2	7,5	7,3	8,0	7,3	8,0	7,3	8,8	7,3	8,5	7,3
		6,20	5,15	3,31	4,51	3,45	4,25	3,67	5,97	3,47	5,87	3,36

Tableau 13 - Influence du pH - TIBC (mg/l)3-7 INFLUENCE DE LA QUANTITE DE HC.Mg AJOUTEE

Nous avons fait varier parallèlement au pH, la quantité de HC.Mg apportée. Les résultats sont regroupés dans le tableau 14.

		LYOTROL			SERONORM				BIOTROL 00			
		A-I	A-II	AX	I		II		I		II	
pH HC.Mg		7,2	7,5	7,3	8,0	7,3	8,0	7,3	8,8	7,3	8,5	7,3
		6,71	5,96	3,69	6,18	4,23	5,74	4,09	8,10	4,34	8,10	4,23
200 mg		6,37	5,45	3,39	5,33	3,93	4,51	3,89	7,16	3,97	7,79	3,87
300 mg		6,20	5,15	3,31	4,51	3,45	4,25	3,67	5,97	3,47	5,87	3,36

Tableau 14 - Influence de la quantité du HC.Mg apportée (TIBC mg/l)

On remarque que la TIBC des sérums animaux du commerce, dépend de la quantité de HC.Mg ajoutée. 100 mg sont très nettement insuffisants, dans le cas du Biotrol 00, à fixer l'excès de fer. Il apparait aussi que cette dépendance est

plus marquée lorsque le pH est supérieur à 8. En effet, lorsque l'on amène par acidification le pH des sérums à 7,3, les valeurs de TIBC obtenues pour des quantités apportées de 100, 200 et 300 mg de HC.Mg présentent des variations moindres.

3-8 INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT AVEC HC.Mg

Nous avons voulu connaître le temps nécessaire pour avoir une adsorption totale de l'excès de fer. Nous avons fait varier le temps de contact entre la solution saturante de fer et le HC.Mg ajouté. La TIBC a été déterminée trois fois pour chaque sérum animal après des temps de contact variant de 5 à 30 minutes (Tableau 15).

	TIBC (mg/l)					
	5 min.	10 min.	15 min.	20 min.	25 min.	30 min.
LYOTROL A-I	6,53	6,24	6,09	6,28	6,12	6,21
SERONORM I	4,97	4,76	4,64	4,45	4,45	4,31
BIOTROL 00-I	7,02	6,54	6,05	5,63	6,06	6,63

Tableau 15 - Influence du temps de contact avec HC.Mg

Les résultats de TIBC du Séronorm sont constants après 20 minutes de contact entre adsorbant et excès de fer ; c'est d'ailleurs le temps retenu pour la détermination des TIBC sur sérum humain.

Les TIBC du Lyotrol A semblent atteindre un plateau lorsque le temps de contact est supérieur ou égal à 10 minutes.

Il est difficile d'interpréter les résultats du Biotrol 00 car les valeurs sont très fluctuantes dans le temps.

IV. CONCLUSIONS

Les résultats recueillis lors de l'étude des divers paramètres indiquent une mauvaise reproductibilité intersérie.

La saturation de la transferrine animale (Seronorm, Lyotrol) est progressive, elle est atteinte pour un apport en fer de 5 mg. Le Biotrol 00, par contre, présente une courbe de fixation totalement différente : la TIBC augmente avec la quantité de fer ajoutée. Tout se passe comme si la transferrine n'était pas seule à intervenir dans la fixation du fer.

La cinétique de fixation du Lyotrol A est proche de celle du sérum humain natif (saturation en 3 minutes). La saturation des deux autres sérums est plus lente (15 minutes).

A l'inverse des sérums humains natifs étudiés précédemment, nous remarquons une influence très nette de la température de la réaction : fixation de fer plus importante à 37°C qu'à température ambiante.

La fixation du fer sur les sérums animaux dépend du degré de dilution du sérum dans la solution de saturation ; elle augmente avec la concentration protéique.

La TIBC montre une dépendance importante vis à vis de la quantité de HC.Mg ajoutée. Cette dépendance est augmentée lorsque le pH du sérum est supérieur à 8 ; elle est peu marquée si on neutralise le sérum à pH 7,3.

Nous avons constaté au cours de ces expériences que les résultats les plus incohérents ont été enregistrés avec le sérum d'origine bovine.

On peut donc se demander si toutes les discordances observées sont dues à l'espèce animale ou à la lyophilisation.

CHAPITRE IV

LA CAPACITE DE LIAISON DE

SÉRUMS ANIMAUX NATIFS

I. PROVENANCE DES SÉRUMS

Pour cette étude, nous avons utilisé des sérums de boeuf, de cheval et de porc. L'ensemble de ces sérums nous ont été fournis par l'Ecole Vétérinaire de Lyon.

Pour chaque espèce, les sérums provenant de plusieurs animaux ont été réunis en un pool.

II. TRAVAIL PERSONNEL

Nous avons procédé à une étude comparative des sérums natifs de ces trois espèces animales.

2-1 REPRODUCTIBILITE INTERSERIE

Au cours de chaque série d'expériences, nous avons eu l'occasion de déterminer la TIBC dans les conditions décrites au chapitre II (paragraphe "Technique"). Les valeurs relevées sont réunies dans le tableau 16.

Les résultats sont très groupés et on peut dire que la reproductibilité est satisfaisante.

	Chiffre Individuel	Chiffre moyen
PORC	3,26 3,37 3,25 3,33	3,30
CHEVAL	3,62 3,63 3,53 3,63	3,60
BOEUF	4,62 4,57 4,73 4,68	4,65

Tableau 16 - Reproductibilité intersérie (TIBC mg/l)2-2 INFLUENCE DE LA QUANTITE DE FER APPORTEE

Nous avons adopté le protocole expérimental déjà suivi pour les sérums animaux lyophilisés du commerce (Chapitre III :3-2). Les courbes de fixation (Figure 17) ont sensiblement la même allure que celles des sérums humains natifs : nous observons une cassure très nette lorsque la saturation de la transferrine est totale.

Un apport en fer compris entre 5 et 15 mg par litre de sérum est nécessaire à la saturation des transferrines de boeuf et de cheval ; 3 mg suffisent dans le cas du porc.

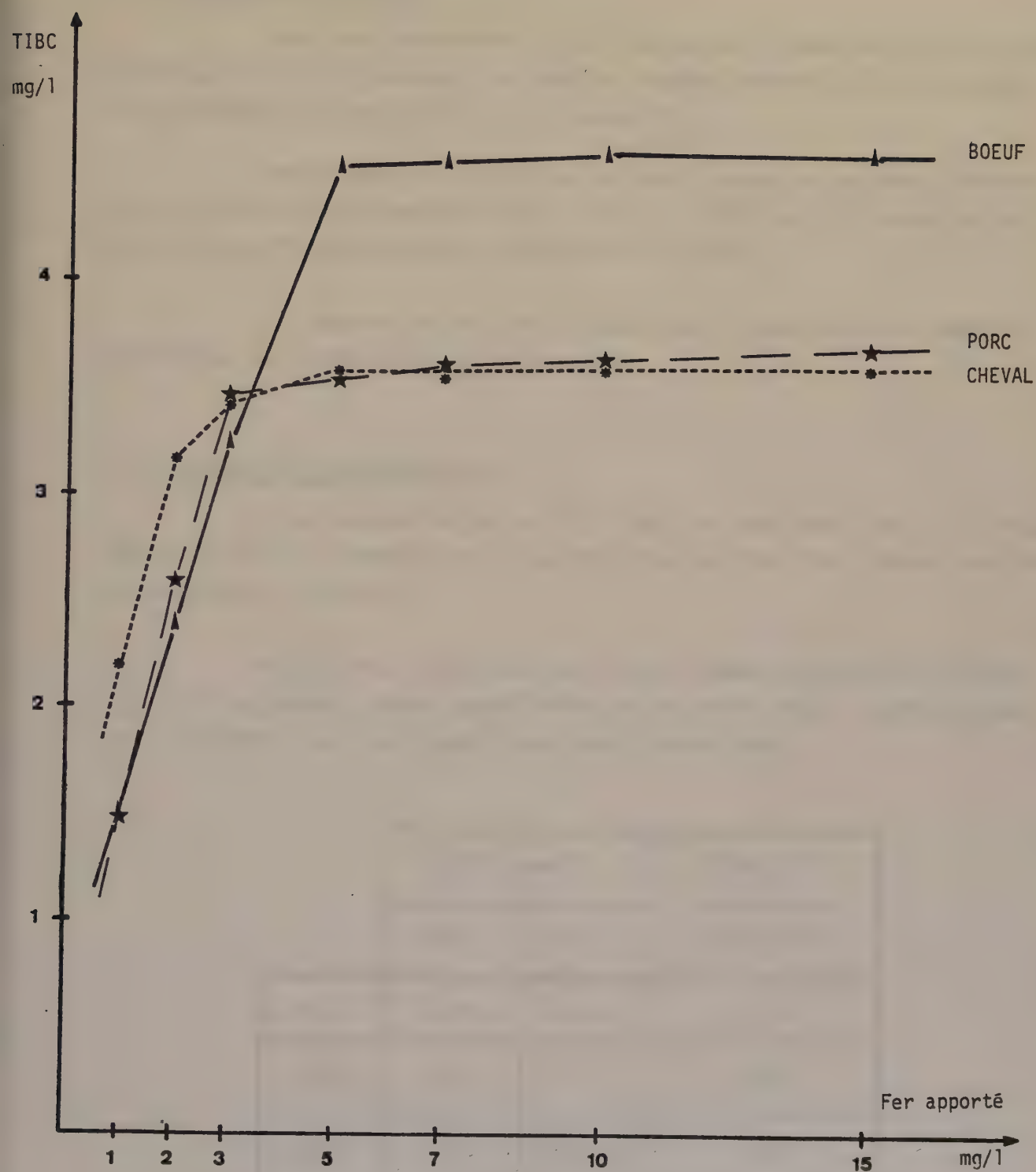


Figure 17 - INFLUENCE DE LA QUANTITE DE FER APPOREE
SERUMS ANIMAUX NATIFS

2-3 CINETIQUE DE FIXATION

Nous avons déterminé la TIBC des sérums animaux natifs en faisant varier, entre 1 et 60 minutes, le temps de contact sérum-solution saturante. Les résultats sont regroupés sur la figure 18.

Les valeurs de la TIBC des sérums de boeuf et de cheval évoluent au cours des quinze premières minutes puis se stabilisent. Le sérum de porc présente une fixation presque instantanée (2 minutes).

La comparaison avec les sérums animaux lyophilisés du commerce montre que les cinétiques sont comparables.

2-4 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

La détermination de la TIBC a été réalisée douze fois pour chaque sérum, à 37°C et à température du laboratoire. Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau 19.

A 37°C, nous constatons une légère augmentation de la TIBC des trois sérums testés. Cette augmentation est toutefois moins importante que celle observée avec les sérums lyophilisés commerciaux.

	TIBC (mg/l)		TIBC 37°
	20°C	37°C	TIBC 20°
PORC	3,25	3,48	1,07
CHEVAL	3,63	3,77	1,04
BOEUF	4,73	4,82	1,02

Tableau 19 - Influence de la température

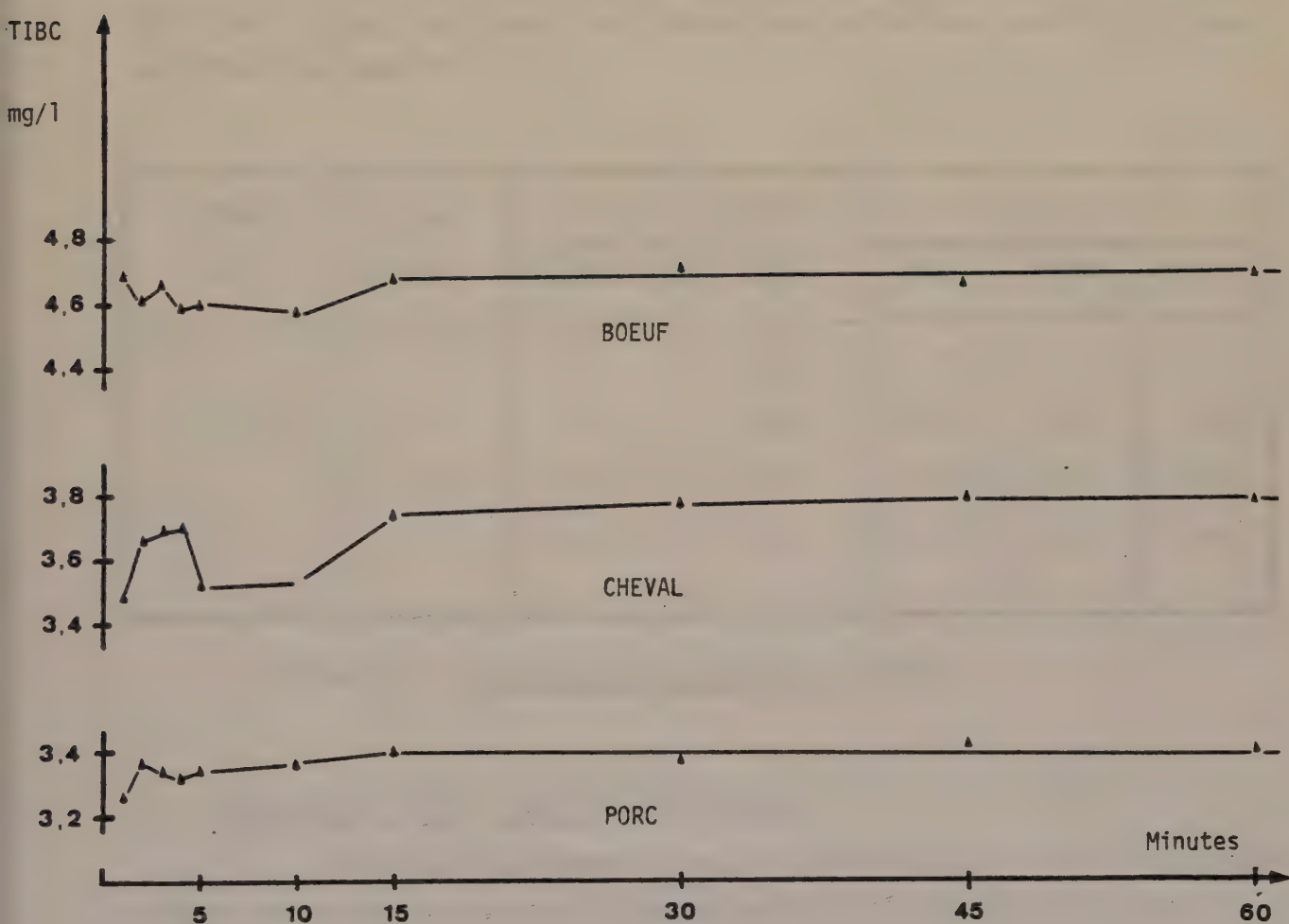


Figure 18 - CINETIQUE DE FIXATION
SERUMS ANIMAUX NATIFS.

2-5 INFLUENCE DU TAUX DE DILUTION DU SERUM

Les dosages ont été pratiqués dans les conditions définies au chapitre III (3-5) ; Tous les essais ont été réalisés en six exemplaires, les moyennes des résultats obtenus sont rassemblées dans le tableau 20.

On constate une légère augmentation des TIBC en fonction de la dilution du sérum, négligeable par rapport aux variations enregistrées avec les sérums du commerce.

Sérum (ml)	Solution Fer (ml)	Titre de la Solution (mg/l)	Dilution Sérum	TIBC (mg/l)		
				PORC	CHEVAL	BOEUF
1,5	5	3	3/13	3,25	3,54	4,71
1,5	3	5	1/3	3,22	3,57	4,79
1,5	1,5	10	1/2	3,26	3,63	4,81
1,5	1	15	3/5	3,20	3,73	4,89

Tableau 20 - Influence de la dilution du sérum

2-6 INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT AVEC HC.Mg

Comme pour les sérums animaux lyophilisés, nous avons fait varier le temps de contact entre la solution saturante de fer et le HC.Mg ajouté.

Pour chaque sérum nous avons fait trois déterminations de la TIBC. Les temps de contact variaient de 5 à 30 minutes (Tableau 21).

La fixation totale de l'excès de fer est très rapide : en effet, pour les trois espèces envisagées, les variations enregistrées au cours du temps sont très faibles. On peut considérer que la fixation est totale dès la cinquième minute de contact.

	TIBC (mg/l)					
	5 min.	10 min.	15 min.	20 min.	25 min.	30 min.
PORC	3,42	3,43	3,35	3,33	3,39	3,33
CHEVAL	3,36	3,43	3,36	3,36	3,41	3,43
BOEUF	4,62	4,65	4,68	4,68	4,60	4,64

Tableau 21 - Influence du temps de contact avec HC.Mg

III. CONCLUSIONS

L'étude des sérums natifs montre une bonne reproductibilité inter-série.

Les courbes de fixation sont superposables à celles des sérums humains natifs avec des cassures nettes correspondant à une saturation totale de la transferrine.

Comme pour le sérum humain natif, la température n'intervient pas de façon significative.

La dilution du sérum n'a aucune influence sur la détermination de la TIBC.

L'excès de fer est fixé très rapidement par le carbonate de magnésium (5 minutes).

On remarque que tout rentre dans l'ordre quand on travaille sur des sérums animaux natifs. On peut donc penser que la lyophilisation entre en jeu pour modifier la capacité du sérum à se saturer en fer.

CHAPITRE V

ESSAI DE LYOPHILISATION

D'UN

SERUM DE BOEUF NATIF

Le chapitre précédent nous a montré que la lyophilisation semblait intervenir sur la détermination de la TIBC. C'est pourquoi nous avons fait lyophiliser un sérum natif d'une espèce animale déjà étudiée. Nous nous sommes adressée à deux laboratoires différents : Biotrol et Biomérieux.

I. CHOIX DE L'ESPECE

Les résultats incohérents donnés par le Biotrol 00 lors de l'étude des sérums animaux commerciaux, nous ont incitée à faire lyophiliser un sérum de boeuf.

II. MODALITES DE LA LYOPHILISATION

L'Ecole Vétérinaire de Lyon nous a fourni un pool de sérums d'origine bovine que nous avons réparti dans deux récipients fermant hermétiquement, de même contenance, déferrisés et stériles. Les flacons ont été placés dans la glace durant leur transport aux laboratoires.

La lyophilisation a été réalisée dès le lendemain par Biomérieux. Le sérum confié au laboratoire Biotrol a d'abord été réparti et congelé puis lyophilisé quinze jours plus tard.

III. TRAVAIL PERSONNEL

3-1 COMPARAISON DE LA CONCENTRATION DES ELECTROLYTES AVANT ET APRES LYOPHILISATION

Afin de mettre en évidence l'influence éventuelle de la lyophilisation, nous avons déterminé certaines constantes biologiques du pool de sérums avant lyophilisation : ionogramme, sidérémie et capacité totale de fixation du fer.

Les valeurs exprimées dans le tableau 22 sont les moyennes de six déterminations.

Chlorures	107	mEq/l
Bicarbonates	24	mEq/l
Potassium	4,2	mEq/l
Sodium	141	mEq/l
Urée	0,12	g/l
Glucose	0,70	g/l
Fer	1,07	mg/l
TIBC	2,16	mg/l

Tableau 22 - Constantes biologiques du
sérum de boeuf natif avant lyophilisation

Après lyophilisation, nous avons de nouveau analysé le sérum. Les ionogrammes ont été réalisés sur les sérums lyophilisés dans les deux laboratoires, après reconstitution par 5 ml d'eau distillée (Tableau 23).

	BIOTROL	BIOMERIEUX
Chlorures	111 mEq/l	104 mEq/l
Bicarbonates	18,5 mEq/l	16,5 mEq/l
Potassium	4,5 mEq/l	4,2 mEq/l
Sodium	150 mEq/l	140 mEq/l
Urée	0,08 g/l	0,06 g/l
Glucose	0,53 g/l	0,50 g/l

Tableau 23 - Ionogramme après lyophilisation

On constate que les deux ionogrammes diffèrent entre eux. La comparaison des ionogrammes avant et après lyophilisation indique que ce traitement entraîne des modifications au niveau de certaines constantes biologiques :

- Diminution prévisible des bicarbonates,
- Baisse de la glycémie, que l'on peut expliquer par l'absence de conservateur,
- Baisse de l'urémie,
- Par contre, les ions Na^+ , K^+ , et Cl^- , présentent des variations plus modérées. Les résultats enregistrés avec le sérum lyophilisé par Biomérieux sont très proches des valeurs d'origine.

3-2 INFLUENCE DE LA QUANTITE DE FER APPORTEE

Sur les sérums reconstitués, nous avons déterminé la TIBC en ajoutant des quantités croissantes de fer, comprises entre 1 et 15 mg par litre de sérum.

Les résultats sont exprimés sur la figure 24.

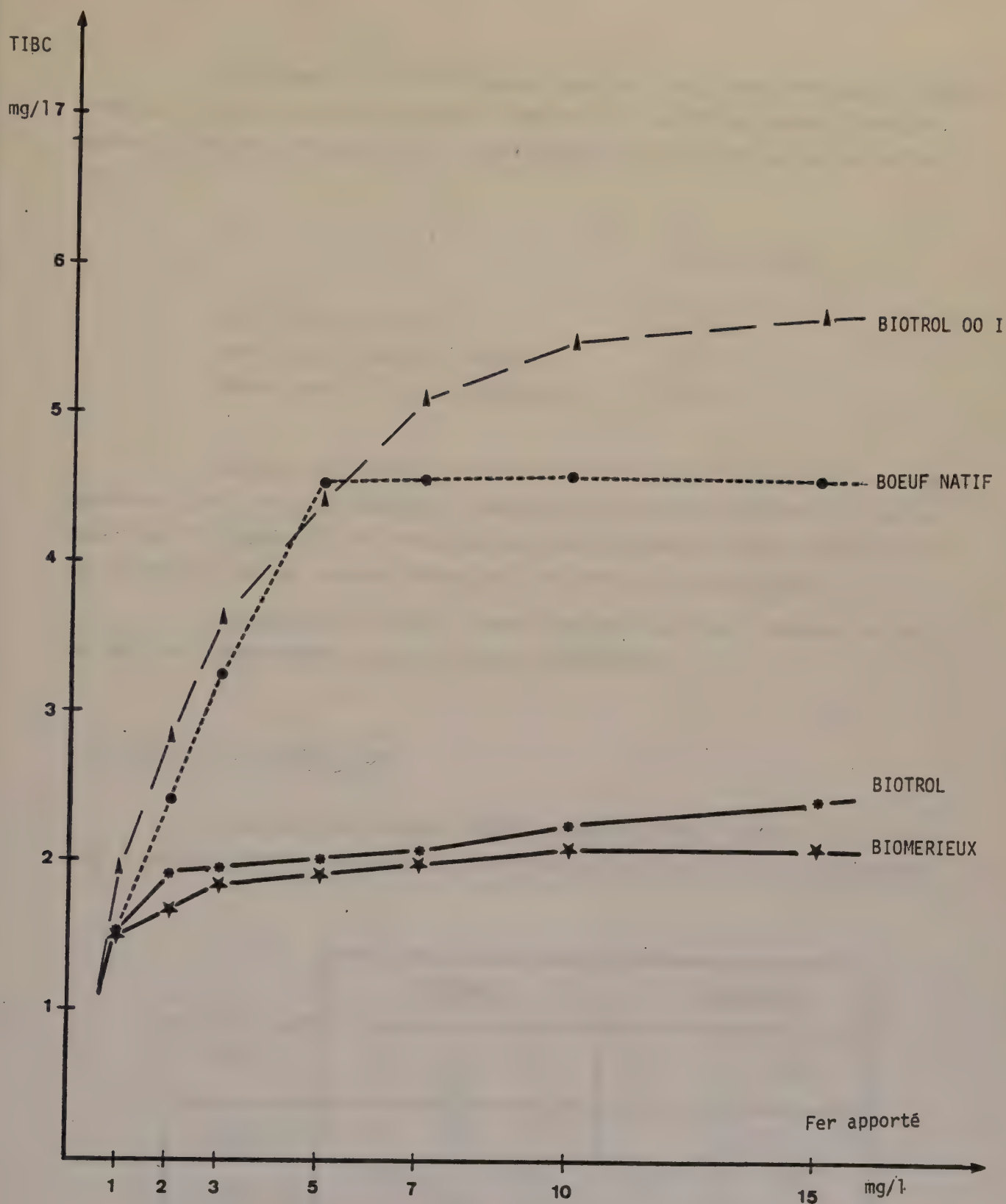


Figure 24 - INFLUENCE DE LA QUANTITE DE FER APPOREE

Les valeurs de TIBC obtenues dans les conditions normales de détermination (10 mg/litre de fer ajouté) comparées à la TIBC du sérum d'origine montre la légère influence de la lyophilisation sur la détermination de la TIBC :

	TIBC (mg/l)
Avant lyophilisation	2,16
Sérum lyophilisé par BIOTROL	2,25
Sérum lyophilisé par BIOMERIEUX	2,10

Les deux courbes de fixation en fonction de la quantité de fer apportée ne sont pas superposables. Comparées aux courbes du Biotrol 00 et du boeuf natif (Figure 24), on remarque que contrairement au boeuf natif, elles ne présentent pas de cassure nette, pas de plateau de saturation.

Cependant, les sérums lyophilisés par les deux laboratoires ont un meilleur comportement que le Biotrol 00 commercial.

3-3 INFLUENCE DU pH DU SERUM

Le pH des deux sérums, après reconstitution, était de 8,3 ; la TIBC a été déterminée à pH 8,3 et après neutralisation à pH 7,0 (Tableau 25)

	BIOTROL		BIOMERIEUX	
pH	8,3	7,0	8,3	7,0
TIBC (mg/l)	2,98	2,03	2,87	2,01

Tableau 26 - Influence du pH

On note l'influence du pH sur la TIBC.

3-4 INFLUENCE DE LA QUANTITE DE HC.Mg AJOUTEE

Nous avons fait varier parallèlement la quantité de HC.Mg ajoutée et le pH du sérum (tableau 26).

Nous avons pratiqué une étude analogue sur des sérums humains lyophilisés :

- Calibre 2, pH initial 7,0
- Valdate Normal, pH initial 8,5
- Monitrol I, pH initial 8,9

Les résultats sont regroupés dans le tableau 27.

La comparaison des deux tableaux montre que la TIBC des sérums lyophilisés d'origine humaine ou animale présente une dépendance marquée vis à vis de la quantité de HC.Mg ajoutée, lorsque leur pH est supérieur à 8.

Cette dépendance tend à disparaître quand on amène le pH des sérums à la neutralité et que l'on ajoute au moins 300 mg de HC.Mg.

		BIOTROL		BIOMERIEUX	
		8,3	7,0	8,3	7,0
TIBC (mg/l)	pH HC.Mg				
	100 mg	5,76	2,67	5,64	2,69
	200 mg	4,59	2,32	4,55	2,26
	300 mg	2,98	2,03	2,87	2,01

Tableau 26 - Influence de la quantité de HC.Mg ajoutée à des pools de sérums animaux lyophilisés

		CALIBRATE 2	VALIDATE NORMAL		MONITROL I	
	pH	7,0	8,5	7,0	8,9	7,0
	HC.Mg					
TIBC (mg/l)	100 mg	4,84	4,47	3,29	7,12	4,84
	200 mg	4,50	3,73	3,21	6,07	4,59
	300 mg	4,38	3,17	3,16	5,26	4,53

Tableau 27 - Influence de la quantité de HC.Mg ajoutée
à des pools de sérums humains lyophilisés

IV. CONCLUSIONS

Des pools d'un même sérum, lyophilisés par deux laboratoires différents n'ont pas tout à fait le même comportement.

Les courbes de fixation obtenues présentent un profil intermédiaire entre le sérum de boeuf natif et le Biotrol 00 du commerce.

Les résultats enregistrés sont meilleurs que ceux des sérums lyophilisés commerciaux ; ceci est probablement dû au fait que ces sérums n'ont reçu aucune addition de conservateurs ou d'autres constituants.

Il semble d'autre part qu'un pH compris entre 7 et 8, après reconstitution du sérum permettrait une utilisation convenable des sérums commerciaux pour la détermination de la TIBC, qu'ils soient d'origine animale ou humaine.

CHAPITRE VI

ESSAI DE DETERMINATION DES CONSTANTES
PHYSICOCHIMIQUES DE LA TRANSFERRINE BOVINE

I. MOBILITE ELECTROPHORETIQUE

Des pools de sérums bovins ont été soumis à une électrophorèse sur acétate de cellulose gélifié et en gel de polyacrylamide à 7,2 % ; les migrations ont été comparées à des sérums humains afin de faciliter le repérage des fractions.

1-1 TECHNIQUES1-1-1 Acétate de cellulose

On utilise des bandes de Cellogel (CHEMETRON) conservées dans du METHANOL à 30%. Les conditions expérimentales sont résumées dans le tableau 28.

Tampon de migration	Tris-Véronal pH 9,2
Echantillon	Volume utilisé 1,5 μ l
Gel	Bande de Cellogel
Migration	Cuve S ₆₀ CHEMETRON Durée: 35 minutes Intensité: 200 volts
Coloration	5 minutes Rouge Ponceau S dans Acide Trichloracétique 5%
Décoloration	Acide acétique à 50%
Transparisation	Bain n°1 Méthanol pur - 3 minutes Bain n°2 Méthanol Acide Acétique Diacétone alcool - 2 minutes

Tableau 28 - Conditions expérimentales de l'électrophorèse
sur Cellogel

Après migration, l'intégration des bandes de Cellogel est réalisée sur un appareil VERNON selon une méthode d'analyse par "Transparence". La lecture se fait en lumière verte.

Un premier passage de la bande dans l'intégrateur nous donne un tracé de la courbe. Un deuxième passage de l'électrophorèse permet de connaître les valeurs de chaque fraction en pourcentage et en g/litre de protéines.

1-1-2 Gel de polyacrylamide

La migration électrophorétique s'effectue selon la technique de DAVIS et ORNSTEIN (10-22) dans des tubes de verres cylindriques dans lesquels sont coulés trois gels successifs :

- Un gel échantillon de concentration égale à 3%
- Un gel d'espacement où se concentre l'échantillon
- Un gel de séparation où s'effectue la migration électrophorétique. La concentration de ce gel est de 7,2 %.

Chaque gel est caractérisé par son degré de polymérisation, c'est-à-dire par la longueur de la chaîne qui conditionne son élasticité et sa viscosité.

Les conditions expérimentales de la technique de DAVIS (10) sont rassemblées dans le tableau 29.

Tampon de migration	Tris-Glycine pH 8,3
Echantillon	Volume utilisé 15 µl
Gel échantillon	Concentration en acrylamide 3 % pH 6,7 Polymérisation : UV + riboflavine
Gel d'espacement	Idem
Gel de séparation	Concentration en acrylamide 7,2 % pH 8,9 Polymérisation : TEMED + Persulfate d'ammonium
Migration	Appareillage : Cuve CANALCO Durée : 50 minutes Intensité : 5 mA/gel
Révélation	30 minutes Noir Amide à 1% dans acide acétique à 7%
Décoloration	Electrodialyse contre ac. acétique 7% QUICK-GEL DESTAINER Canalco

Tableau 29 - Conditions expérimentales de l'électrophorèse
en gel de polyacrylamide

Après migration, les gels de polyacrylamide sont introduits grâce à un porte-échantillons dans un appareil intégrateur VERNON. La lecture se fait en lumière rouge (620 nm).

L'appareil intègre la surface de chaque fraction et trace une courbe représentative sur papier millimétré ; un deuxième passage de l'électrophorèse permet de connaître les pourcentages respectifs des différentes fractions. Ces derniers sont ensuite transformés en valeurs absolues (g/litre de globulines).

1-2 RESULTATS

1-2-1 Sérum de boeuf natif

Nous avons soumis un sérum bovin natif à une électrophorèse sur Cellogel et en gel de polyacrylamide (Figures 30 et 31).

- Electrophorèse sur Cellogel

- . Pic important d'albumine
- . Bloc d' α globulines : les α_1 , et α_2 globulines migrent ensemble et donnent un seul pic.
- . Pic de β globulines, correspondant à la transferrine. Il semblerait d'après le tracé qu'il existe un deuxième pic de β globulines mais la comparaison avec une électrophorèse de sérum humain montre que ce deuxième pic se situe au niveau des γ globulines.
- . Pic important de γ globulines.

- Gel de polyacrylamide

- . Pic d'albumine écrêté par l'intégrateur car sa concentration est très supérieure à celle de chacune des fractions globuliniques.
- . Fraction 1, ou post-albumines ; on note l'existence de trois fractions distinctes.
- . Fraction 2 (Haptoglobine et Transferrine).

Un dosage de l'haptoglobine s'est révélé négatif.

La fraction 2 correspond donc à la transferrine uniquement.

- . Fraction 3 : fraction du complément.
- . Immunoglobulines.

On a déterminé les protéines totales par réfractométrie (56 g/l), les globulines par précipitation au sulfate-sulfite de sodium et enfin le rapport

Albumine	(A/G)	:	- Albumine	25 g/l
Globulines			- Globulines	31 g/l
			- A/G	0,81

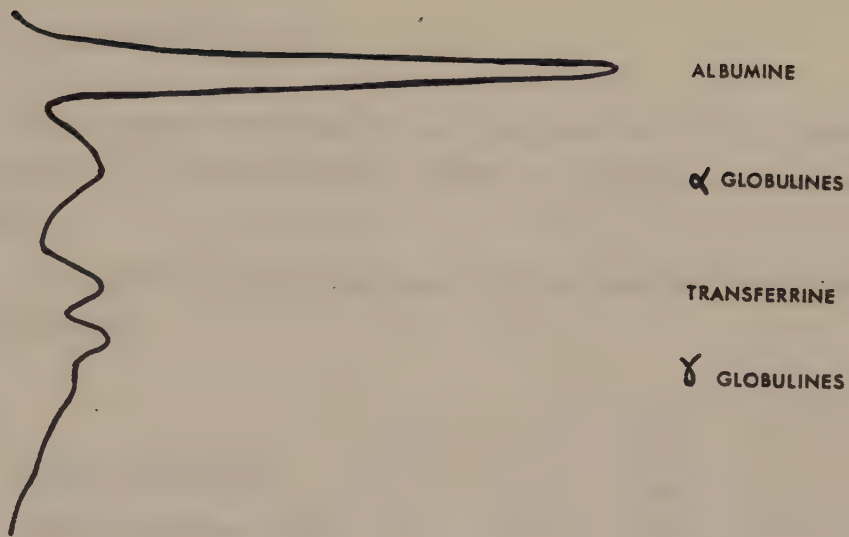


Figure 30 - Boeuf natif
Electrophorèse sur Acétate de cellulose

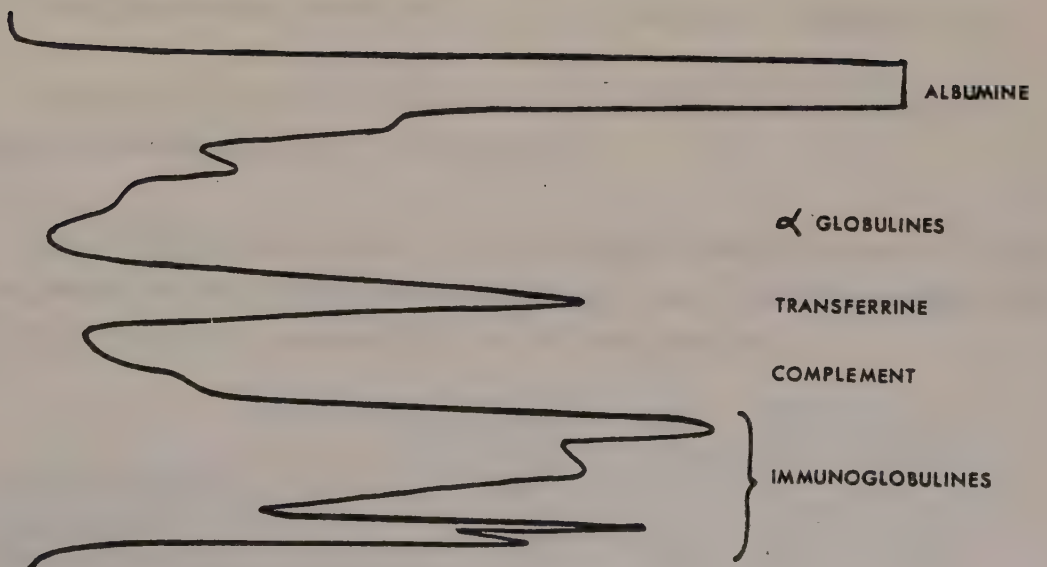


Figure 31 - Boeuf natif
Electrophorèse en Gel de polyacrylamide

1-2-2 Surcharge en transferrine bovine

1-2-2-1 Sur sérum bovin natif

Nous avons surchargé le pool de boeuf natif (S_0) avec de la transferrine bovine (*) introduite sous forme de transferrine pure pesée avec exactitude .

Cette pesée a été effectuée à la balance de précision selon le protocole suivant :

	S_1	S_2	S_3	S_4
Transferrine (mg)	25	35	50	75
Pool de sérums (ml)	50	50	50	50
Transferrine ajoutée (g/l)	0,50	0,70	1,00	1,50

La dissolution de la transferrine a été presque instantanée. Les quatre surcharges (S_1 , S_2 , S_3 , S_4) ont été soumises à une électrophorèse sur acétate de cellulose et en gel de polyacrylamide.

On constate après étude des tracés que la mobilité électrophorétique de la transferrine est identique à celle du sérum non surchargé (S_0).

Sur Cellogel, on n'enregistre aucune modification des pics de β globulines correspondant à la transferrine.

Sur Gel de polyacrylamide, la surcharge se manifeste sur le tracé par une augmentation de surface des pics qui se traduit par une augmentation progressive de la valeur absolue (g/l) de la transferrine :

	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4
Transferrine (g/l)	6	6,3	6,8	7,1	7,6
Surcharge en Transferrine (g/l)		0,50	0,70	1,00	1,50

(*) CALBIOCHEM n° 616396

1-2-2-2 Sur sérum lyophilisé du commerce

Nous avons réalisé une étude de surcharge en transferrine bovine, dans les conditions décrites au paragraphe précédent, sur un pool de sérum commercial Biotrol 00 reconstitué.

Les tracés électrophorétiques (figures 32 et 33) présentent un pic de γ globulines plus important que celui du boeuf natif tout en conservant un profil général sensiblement identique.

On a déterminé les protéines totales par réfractométrie (72 g/l), les globulines par précipitation et le rapport $\frac{\text{albumine}}{\text{globulines}}$:

. On note que l'albumine reste identique (26 g/l)

. Le taux de globulines est plus élevé que celui du sérum bovin natif (45,4 g/l), ce qui entraîne une diminution du rapport A/G (0,61).

La surcharge en transferrine bovine est là aussi mise en évidence, après électrophorèse en gel de polyacrylamide, par une augmentation progressive de la surface du pic de transferrine et de sa valeur absolue.

	S' ₀	S' ₁	S' ₂	S' ₃	S' ₄
Transferrine (g/l)	7,8	7,8	8,2	8,5	8,8
Surcharge en Transferrine (g/l)		0,50	0,70	1,00	1,50

1-3 CONCLUSIONS

L'étude de la mobilité électrophorétique de la transferrine bovine montre que cette transferrine est une β globuline. Une étude plus approfondie de BRION A. et FONTAINE M. (7) indique qu'il s'agit d'une β_2 globuline.

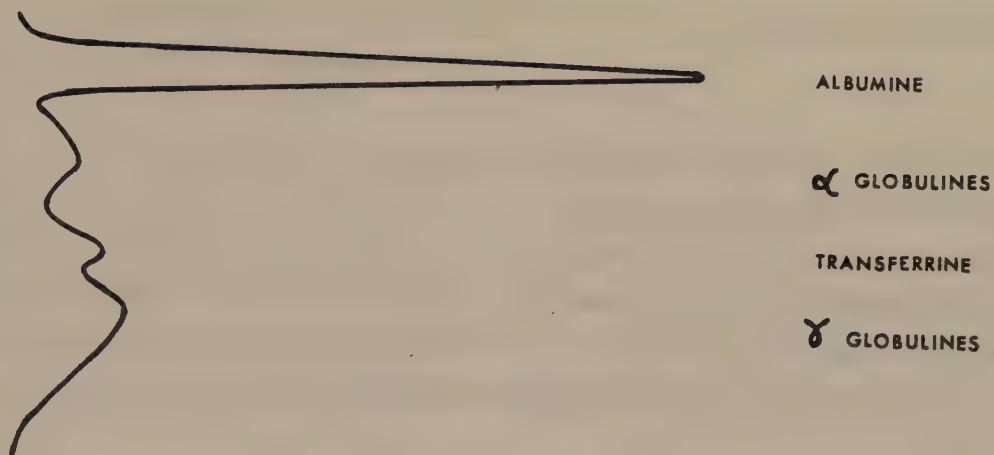


Figure 32 - BIOTROL 00

Electrophorèse sur acétate de cellulose

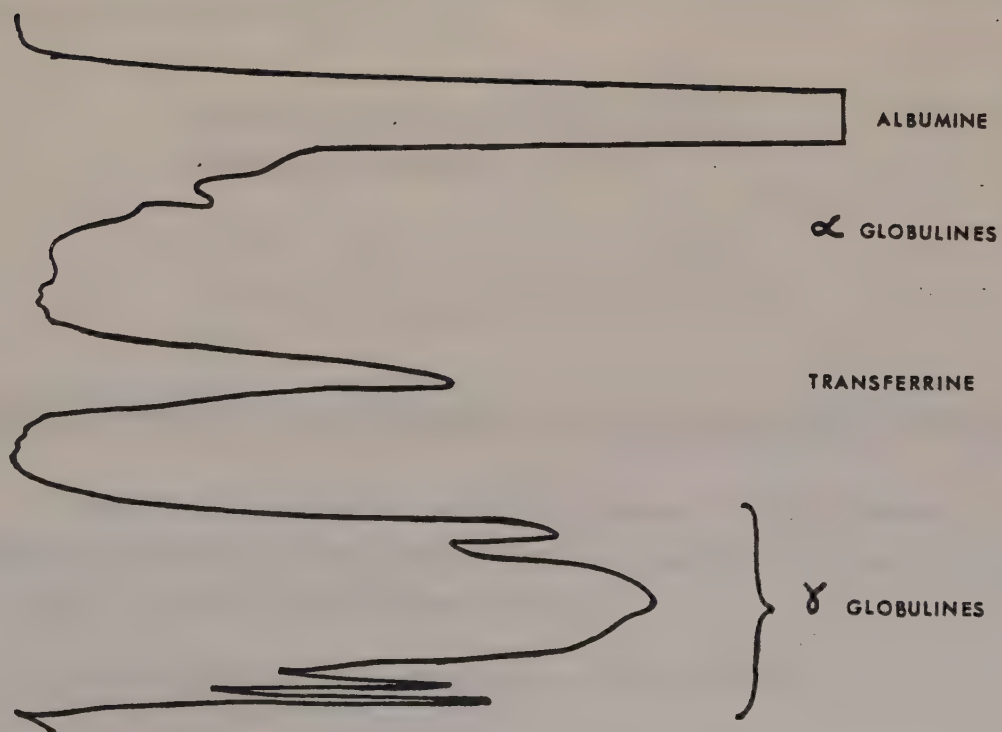


Figure 33 - BIOTROL 00

Electrophorèse en Gel de polyacrylamide

Une surcharge en transferrine bovine sur sérum natif et Biotrol 00 donne des résultats superposables :

La technique sur acétate de cellulose n'est pas assez sensible pour mettre en évidence l'augmentation de la teneur en transferrine des sérums surchargés. Inversement, la transferrine ajoutée est bien retrouvée en gel de polyacrylamide : elle se superpose exactement à la transferrine native ou à la transferrine du sérum lyophilisé. On peut donc dire que la lyophilisation ne modifie ni la mobilité électrophorétique, ni le poids de la protéine.

II. APTITUDE A LIER LE FER

2-1 TECHNIQUE

Nous avons utilisé pour cette étude, le sérum bovin natif, le Biotrol 00 et les quatre surcharges décrites précédemment.

Pour chaque sérum pur ou surchargé, la TIBC a été déterminée dans différentes conditions expérimentales :

- Solution saturante de fer à 5 mg/l
Température ambiante et 37°C
- Solution saturante de fer à 10⁰mg/l
Température ambiante et 37°C.

2-2 CALCUL DU NOMBRE DE μ g DE FER FIXES PAR mg DE TRANSFERRINE BOVINE AJOUTEE

Pour chaque surcharge, nous avons comparé la TIBC obtenue à celle du sérum non surchargé, ce qui nous a permis de calculer le nombre de μ g de fer fixés par mg de transferrine ajoutée.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 34.

Solution Saturante de fer	Sérums		TIBC (mg/l) à 20°C	µg fer fixés par mg de transferrine	TIBC (mg/l) à 37°C	µg fer fixés par mg de transferrine
5 mg/l	BOEUF NATIF	S ₀	2,71		2,72	
		S ₁	2,58	0	3,03	0,62
		S ₂	3,16	0,64	3,35	0,90
		S ₃	3,36	0,65	3,52	0,80
		S ₄	3,74	0,68	3,88	0,77
	BIOTROL 00	S' ₀	4,01		4,24	
		S' ₁	4,28	0,54	4,49	0,50
		S' ₂	4,44	0,61	4,78	0,77
		S' ₃	4,71	0,70	4,90	0,66
		S' ₄	4,96	0,63	5,03	0,52
10 mg/l	BOEUF NATIF	S ₀	2,85		2,86	
		S ₁	3,12	0,54	3,26	0,60
		S ₂	3,48	0,90	3,72	1,23
		S ₃	3,54	0,69	3,62	0,76
		S ₄	3,82	0,65	3,98	0,75
	BIOTROL 00	S' ₀	5,47		6,12	
		S' ₁	5,48	0	6,24	0,24
		S' ₂	5,90	0,61	6,23	0,24
		S' ₃	5,91	0,54	6,52	0,40
		S' ₄	5,79	0,21	6,78	0,44

Tableau 34 - Aptitude à lier le fer.Pools de sérums surchargés en transferrine bovine

L'ensemble de ces valeurs montre que la transferrine bovine fixe beaucoup moins de fer que la transferrine humaine. En effet, nous avons vu que la transferrine humaine fixe 1,24 µg de fer par mg de transferrine pure.

Afin de vérifier la validité des résultats, nous avons surchargé un pool de sérum humain (H_0) en transferrine bovine. Les surcharges réalisées H_1 et H_2 correspondent respectivement à des apports en transferrine bovine de 1,00 et 1,50 g/l de sérum. Nous avons déterminé les TIBC (Tableau 35).

	TIBC (mg/l) à 20°C	µg fer fixés par mg de transferrine bovine
H_0	2,30	
H_1	3,22	0,92
H_2	3,48	0,79

Tableau 35 - Aptitude à lier le fer
Pool de sérums humains surchargés en transferrine bovine

2-3 DISCUSSION

Les résultats obtenus indiquent que la transferrine bovine n'a pas le même comportement que la transferrine humaine. Deux hypothèses peuvent être envisagées :

- Le poids moléculaire est différent
- La molécule ne possède qu'un seul site de fixation du fer.

2-3-1 Poids moléculaire

Le poids atomique du fer stable est de 55,847 mg. La transferrine humaine, de poids moléculaire 89 000, a deux sites de fixation, c'est à dire

que $2 \times 55,847$ soit environ 112 mg de fer se fixent sur 89000 mg de transferrine.

L'épreuve de surcharge du sérum humain a donné 0,92 μg et 0,79 μg de fer fixés pour un milligramme de transferrine bovine ajouté. Si on considère que cette transferrine possède deux sites de fixation, son poids moléculaire devrait être de l'ordre de 121 000 à 141 000.

2-3-2 Nombre de sites de fixation

Le poids moléculaire calculé semble élevé pour une β globuline ; s'il était exact, par électrophorèse en gel de polyacrylamide, on devrait retrouver la bande protéique au niveau des IgA globulines, ce qui n'est pas le cas.

On est donc amené à penser que la molécule ne possède qu'un seul site de fixation.

La fixation du fer par la transferrine bovine ajoutée à un sérum de boeuf lyophilisé commercial (Biotrol 00) est nettement inférieure à celle du sérum natif ; les résultats sont difficilement interprétables.

Si on considère l'aptitude à fixer le fer de la transferrine bovine ajoutée au sérum natif de boeuf, un mg de transferrine fixe entre 0,65 et 0,75 μg de fer ; en admettant l'hypothèse d'un seul site de fixation on obtient alors un poids moléculaire de la transferrine bovine compris entre 74 600 et 86 100, c'est à dire des valeurs proches du poids moléculaire de la transferrine humaine.

Il semble donc que la transferrine bovine ait un poids moléculaire voisin de celui de la transferrine humaine, mais qu'elle ne possède qu'un site de fixation du fer.

On ne peut cependant expliquer l'influence de la température sur l'aptitude de la transferrine bovine à fixer le fer.

CHAPITRE VII

CONCLUSIONS

Nous nous sommes attachée à vérifier l'utilité des sérums commerciaux d'origine animale dans le contrôle de la TIBC.

Nous avons étudié sur des sérums humains natifs, différents paramètres susceptibles d'intervenir dans la détermination de la TIBC :

- Reproductibilité
- Influence de la quantité de fer apportée
- Cinétique de fixation
- Influence de la température
- Influence du pH du sérum
- Influence de la quantité de HC.Mg ajoutée.

Ces paramètres n'ont pas d'influence appréciable sur la TIBC.

Une étude identique sur des sérums animaux lyophilisés du commerce a montré que la transferrine n'est pas seule à fixer le fer, qu'il y a une nette dépendance de la TIBC vis à vis de la température, du pH du sérum, de la quantité de HC.Mg ajoutée et du taux de dilution du sérum dans la solution de saturation.

Nous avons voulu savoir si ces discordances entre sérums animaux commerciaux et sérums humains étaient liées à l'espèce d'origine ou à la lyophilisation.

Nous avons constaté que les anomalies de fixation disparaissaient dès que l'on travaille sur des sérums animaux natifs. Il semble donc que seule la lyophilisation soit en cause.

Deux échantillons d'un même sérum de boeuf lyophilisé par deux laboratoires différents n'ont pas montré le même comportement. Cependant, les résultats obtenus sont meilleurs que ceux enregistrés avec les sérums commerciaux. Nous pensons que cette amélioration est due au fait qu'ils n'ont reçu aucun additif au cours de la lyophilisation.

Il semble d'autre part qu'après reconstitution des sérums, un pH compris entre 7 et 8 permette une meilleure utilisation des sérums lyophilisés animaux et humains du commerce.

Nous avons prolongé l'étude du sérum de boeuf par un essai de détermination des constantes physicochimiques de la transferrine bovine. Il s'agit d'une β_2 globuline dont le poids moléculaire semble voisin de celui de la transferrine humaine et qui ne posséderait qu'un seul site de fixation du fer.

Vu, Le Directeur de l'U.E.R.
des sciences pharmaceutiques

Professeur CH. A. BIZOLLON

Le Président de la Thèse

Professeur J. DORCHE

VU et PERMIS D'IMPRIMER
LYON, le 18 Mai 1977

Le président de l'Université
Claude Bernard,

Professeur D. GERMAIN

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - AISEN P., LEIBMAN A., REICH H.A.
Studies on the binding of iron transferrin and conalbumin.
J. Biol. Chem., 1966, 241, 1666-1671.

- 2 - BAILLY M., BRETAUDIERE J.P., DUMONT G., LANIADO M., PHUNG H.T.
Du comportement des sérums utilisés pour les contrôles de qualité interlaboratoires.
Organisation des laboratoires. Biologie prospective. III Colloque de Pont-à-Mousson. L'expansion, Paris, 1975, 63-69.

- 3 - BARBE M., BOUVIER J.L., DREUX C.
Essai de comparaison de sérums de contrôle d'origine humaine ou animale.
Organisation des laboratoires. Biologie prospective. II Colloque de Pont-à-Mousson. L'expansion, Paris, 1972, 425-429.

- 4 - BEZKOROVAINY A., GROHLICH D.
The behaviour of native and reduced-alkylated human transferrin in urea and guanidine-HCL solutions.
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 147, 497-510.

- 5 - BEZKOROVAINY A., SZCHOCKE R.H.
Structure and function of transferrins. I Physical, chemical and iron-binding properties.
Arzneim. Forsch., 1974, 24, N°4, 476-485.

- 6 - BEZKOROVAINY A., ZSCHOCKE R.H.
Structure and function of transferrins. II Transferrin and iron metabolism.
Arzneim. Forsch., 1974, 24, N°5, 726-737.

- 7 - BRION A., FONTAINE M.
Formulaire vétérinaire de pharmacologie, de thérapeutique et d'hygiène.
VIGOT 13 ème Ed., 1973.

- 8 - BUTLER V.
Disadvantages in the use of animal serum for quality control of serum iron-binding capacity estimation.
Clin. Chim. Acta, 1973, 43, 451-452.

- 9 - BÜTTNER J., BORTH R., BOUTWELL J.H., BROUGHTON P.M.G., BOWYER R.G.
Provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. Part.3. Calibration and control materials.
Clin. Chim. Acta, 1977, 75, F_{II} - F₂₀.

- 10 - DAVIS B.J.
Disc electrophoresis. II Method and application to human serum proteins.
Ann. New-York Acad. Sc., 1964, 121, 404-427.

- 11 - DIXON K.
Routine clinical measurements of transferrin in human serum.
Ann. Clin. Bioch., 1973, 10, 127-131.

- 12 - GREENE F.C., FEENEY R.E.
Physical evidence for transferrins as single polypeptide chains.
Biochem., 1968, 7, 1366-1371.

- 13 - GRUBER W., KLARWEIN M., MOLLERING H.
Comparaison of control sera, containing enzymes of human and animal origin.
Clin., Chem., 1975, 21, 963.

- 14 - HARRIS D.C., AISEN P.
Iron-donating properties of transferrin.
Biochem., 1975, 14, 262-268.

- 15 - LEGGATE J., CROOKS A.E.
Problems in quality control in determinations of serum total iron-binding capacity by the magnesium carbonate method.
J. Clin. Path., 1972, 25, 905-906.

- 16 - LESTAS A.N.
The effect of pH upon human transferrin : selective labelling of the two iron-binding sites.
Br. J. Haem., 1976, 32, 341-350.

- 17 - LEVEY S., JENNINGS E.R.
The use of control charts in the clinical laboratory.
Am. J. Clin. Path., 1950, 20, 1059-1066.

- 18 - LUKENS J.N.
Iron deficiency and infection.
Am. J. Dis. Child., 1975, 129, 160-162.

- 19 - MASASHI ITANO M.D.
Iron binding capacity.
Am. J. Clin. Path., 1976, 66, 244-247.
- 20 - MOINUDDIN M., WITTER R.F., QUIST K.D.
Bovine blood serum, as a substitute for human serum for quality control of the determination of cholesterol and triglycerides.
Clin. Chem. Acta., 1972, 37, 123.
- 21 - NYSSSEN M.
La transferrine. Etude analytique et physiopathologique.
Thèse Pharmacie. Lyon, 1974.
- 22 - ORNSTEIN L.
Disc electrophoresis. I Background and theory.
Ann. New-York Acad. Sc., 1964, 121, 321-349.
- 23 - POZET S.
Préparation des sérums de contrôle. Contrôle de qualité des examens de laboratoire.
SIMEP Ed., Lyon, 1971, 71-73.
- 24 - PRICE E.M., GIBSON J.F.
A re-interpretation of bicarbonate-free ferric transferrin E.P.R. spectra.
Biochem. Biophys. Res., Commun., 1972 b, 46, 646.

- 25 - RAMSAY W.N.M.
The determination of total iron-binding capacity in serum.
Clin. Chim. Acta, 1957, 2, 221-226.

- 26 - SCHADE A.L., CAROLINE L.
An iron-binding component in human blood plasma.
Science, 1946, 104, 340-341.

- 27 - SCHULTZE H.E., HELDE K., MULLER H.
Uber Transferrin.
Behringwerk Mitt., 1957, N°32-25.

- 28 - STEELE B.W., KOEHLER D.F., BLASZKOWSKI T.P., AZAR M.
An example of lyophilized protein-based materials not simulating patient sera.
Clin. Chem., 1975, 21, 1812-1814.

- 29 - TROUYEZ G.
Les sérums de contrôle. Origine et mode de préparation.
Organisation, automatisation des laboratoires.
Biologie prospective. I Colloque de Pont-à-Mousson.
L'expansion, Paris, 1970, 109-114.

- 30 - VERNET-NYSSSEN M.
La capacité totale de fixation du fer par le sérum : problèmes posés
par l'utilisation des sérums de contrôle du commerce.
Ann. Biol. Clin. 1976, 34, 259-268.

31 - WEINBERG E.

Iron and susceptibility to infectious disease.

Science, 1974, 184, 952-956.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
CHAPITRE II : LA FIXATION DU FER SUR LA TRANSFERRINE HUMAINE . .	4
I RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES PROPRIETES PHYSICO- CHIMIQUES DE LA TRANSFERRINE	4
II ETUDE PERSONNELLE	5
2-1 MATERIEL ET METHODE	5
2-1-1 Principes des méthodes	5
2-1-1-1 Fer sérique	5
2-1-1-2 Capacité totale de fixation du fer (TIBC) . .	6
2-1-2 Matériel	6
2-1-3 Technique	6
2-1-3-1 Réactifs	6
2-1-3-2 Manifold	8
2-1-3-3 Manipulation	8
2-1-3-4 Calculs	10
2-2 RESULTATS SUR POOL DE SERUMS HUMAINS	10
2-2-1 Répétabilité	10
2-2-2 Influence de la quantité de fer apportée . . .	11
2-2-3 Cinétique de fixation	11
2-2-4 Influence de la température	14
2-2-5 Influence du pH du sérum	14
2-2-6 Influence de la quantité de HC.Mg ajoutée pour adsorber l'excès de fer	14
III CONCLUSIONS	15

CHAPITRE III :	CAPACITE TOTALE DE LIAISON DU FER PAR DES SERUMS ANIMAUX LYOPHILISES COMMERCIAUX	16
I	RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE DE L'UTILISATION DE SERUMS ANIMAUX POUR L'ETUDE DE LA TIBC	16
II	MATERIEL ET METHODE	17
2-1	MATERIEL	17
2-1-1	Espèces choisies	17
2-1-2	Produits testés	17
2-2	METHODE	17
III	TRAVAIL PERSONNEL	18
3-1	REPRODUCTIBILITE	18
3-1-1	Reproductibilité intrasérie (Répétabilité) . . .	18
3-1-2	Reproductibilité intersérie	19
3-2	INFLUENCE DE LA QUANTITE DE FER APPORTEE . . .	19
3-3	CINETIQUE DE FIXATION	22
3-4	INFLUENCE DE LA TEMPERATURE	22
3-5	INFLUENCE DU TAUX DE DILUTION DU SERUM	24
3-6	INFLUENCE DU pH DU SERUM	25
3-7	INFLUENCE DE LA QUANTITE DE HC.Mg AJOUTEE . . .	26
3-8	INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT AVEC HC.Mg . . .	28
IV	CONCLUSIONS	28
CHAPITRE IV :	LA CAPACITE DE LIAISON DE SERUMS ANIMAUX NATIFS	29
I	PROVENANCE DES SERUMS	29
II	TRAVAIL PERSONNEL	29
2-1	REPRODUCTIBILITE INTERSERIE	29
2-2	INFLUENCE DE LA QUANTITE DE FER APPORTEE . . .	30

2-3	CINETIQUE DE FIXATION	32
2-4	INFLUENCE DE LA TEMPERATURE	32
2-5	INFLUENCE DU TAUX DE DILUTION DU SERUM	34
2-6	INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT AVEC HC. Mg	34
III	CONCLUSIONS	35
CHAPITRE V	: ESSAI DE LYOPHILISATION D'UN SERUM DE BOEUF NATIF	36
I	CHOIX DE L'ESPECE	36
II	MODALITES DE LA LYOPHILISATION	36
III	TRAVAIL PERSONNEL	37
3-1	COMPARAISON DE LA CONCENTRATION DES ELECTROLYTES AVANT ET APRES LYOPHILISATION.	37
3-2	INFLUENCE DE LA QUANTITE DE FER APPORTEE	38
3-3	INFLUENCE DU pH DU SERUM	40
3-4	INFLUENCE DE LA QUANTITE DE HC.Mg AJOUTEE	41
IV	CONCLUSIONS	42
CHAPITRE VI	: ESSAI DE DETERMINATION DES CONSTANTES PHYSICOCHI- MIQUES DE LA TRANSFERRINE BOVINE	43
I	MOBILITE ELECTROPHORETIQUE	43
1-1	TECHNIQUES	43
1-1-1	Acétate de cellulose	43
1-1-2	Gel de polyacrylamide	44
1-2	RESULTATS	46
1-2-1	Sérum de boeuf natif	46
1-2-2	Surcharge en transferrine bovine	48
1-2-2-1	Sur sérum bovin natif	48
1-2-2-2	Sur sérum lyophilisé du commerce	49
1-3	CONCLUSIONS	49

II	APTITUDE A LIER LE FER	51
2-1	TECHNIQUE	51
2-2	CALCUL DU NOMBRE DE μg DE FER FIXES PAR mg DE TRANSFERRINE BOVINE AJOUTEE	51
2-3	DISCUSSION	53
2-3-1	Poids moléculaire	53
2-3-2	Nombre de sites de fixation	54
CHAPITRE VII :	CONCLUSIONS	55

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

